

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

PUBLIÉES PAR

LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR

Avec le concours des Chefs de Service
et des Chefs de Laboratoire

Secrétaire général : P. LÉPINE



MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

Libraires de l'Académie de Médecine

120, Boulevard Saint-Germain

PARIS.

SOMMAIRE DU N° 3

- † Charles Dopter (1873-1950).
- Stabilité des types bactériophagiques de *Salmonella paratyphi* B et valeur épidémiologique de la lysotypie par la méthode de Felix et Callow, par P. NICOLLE, A. JUDE et R. BUTTIAUX
- Evolution et conditions de stérilisation des cultures bactériennes en présence de bactériophages, par R. WAHL et A. TERRADE
- Études sur le collagène. — V. Collagénases bactériennes et pouvoir anti-collagénasique des sérums humains normaux, par ALBERT DELAUNAY, MAYLIS GUILLAUMIE, ALI BOUJNAH et GUY BASSET
- Antibiotiques et lyse bactériophagique. — V. Sur la fixation et la multiplication du phage staphylococcique Twort en présence de la streptomycine, par EWALD EBLINGER.
- Méthode de titrage du *Mycobacterium tuberculosis* aux antibiotiques, par P.-J. COLETOS, H. BOISVERT et M^{lle} ORIOT
- Recherches physiologiques sur *Endosporus azotophagus* (Tchan et Pochon 1950) fixateur d'azote (premier mémoire), par Y.-T. TCHAN
- La pyrimidine, facteur de croissance pour les *Sporotrichum*, par E. DROUHET et F. MARIAT.
- Action de l'aneurine et de ses constituants sur quelques mucoracées pathogènes, par F. MARIAT et E. DROUHET.
- Société française de microbiologie (Sommaire page 4 de la couverture)

- Œuvres de Pasteur** réunies par PASTEUR VALLERY-RADOT, tome « Mélanges scientifiques et littéraires. Index analytique de l'œuvre Pasteur ». Un vol. gr. in-8° de 666 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939.
- Albert Calmette. Sa vie. Son œuvre scientifique**, par P.-NOËL BERNARD et LÉOPOLD NEGRE. *Préface de Pasteur Vallery-Radot. Avant-propos de A. Yersin*. Un vol. de 274 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939.
- J. BORDET. — **Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses**. Deuxième édit. Un volume de 880 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939.
- ANDRÉ-R. PREVOT. — **Manuel de classification et de détermination bactéries anaérobies**. Un volume in-8° de 290 pages, 2^e édition (*Monographie de l'Institut Pasteur*). Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1948.
- MARGUERITE LWOFF. — **Recherches sur le pouvoir de synthèse flagellés trypanosomides**. Un vol. de 244 pages (*Monographie de l'Institut Pasteur*). Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1941.
- EDM. SERGENT, A. DONATIEN, L. PARROT et F. LESTOQUARD (*in memoriam*). — **Études sur les piroplasmoses bovines**. Un vol. in-16 816 pages, 325 illustrations, 1945 (*Institut Pasteur, Alger*).

N. B. — Le paiement est accepté en toutes monnaies étrangères au cours du dollar au moment du règlement.

PRIX DE L'ABONNEMENT POUR 1950

France et Union Française Fr. 2.000

(Règlement par mandat, chèques postaux [Compte n° 599 Paris] ou chèque bancaire.)

Belgique et Luxembourg Fr. B. 375

Autres pays \$ U. S. A. 7

Prix également payables dans les autres monnaies au cours des règlements commerciaux le jour du paiement.
(Règlement par Banque Nationale.)

Changement d'adresse : 20 fr.

Secrétariat, 25, rue du Docteur-Roux, Paris (XV^e).

Publication mensuelle.

TRAITEMENT DE L'AMIBIASE INTESTINALE SUBAIGUE & CHRONIQUE ET DE TOUS SYNDROMES COLITIQUES, INFECTIEUX ET TOXI-ALIMENTAIRES

RHODIACARBINE

Sous-nitrate de bismuth..... 25grs
Mixiod..... 1gr.
Poudre d'Ipéca..... 1gr.
Charbon végétal..... 25grs
Excipient q.s. pour..... 100grs

PRÉSENTÉ SOUS FORME DE
GRANULÉ
BOITES MÉTALLIQUES

(150 grs environ)

*Anciennement "Pâte Spéciale
granulée antidiysentérique"*

COMPRIMÉS

TUBES DE 20 COMPRIMÉS

*1 à 3 comprimés ou cuillerées
à café de granulé, à chacun
des principaux repas, tous
les 2 jours; donner le jour
intermédiaire un sel
arvenical organique :*
STOVAR SOL

CONSERVATION
PARFAITE SOUS
TOUS LES CLIMATS

**SOCIÉTÉ PARISIENNE
D'EXPANSION CHIMIQUE
SPÉCIA**

MARQUES POULENC FRÈRES
ET USINES DU RHÔNE
21, rue Jean Goujon - PARIS 8^e

Verre Vitrification

5, Rue de Crimée
PARIS-XIX^e



MACHINES A IMPRIMER

OYONNAX -  - FRANCE

10, Boulevard Dupuy — Tél. 3-55

MACHINES SPÉCIALES POUR L'IMPRESSION
DES AMPOULES ET DES FLACONS

CATALOGUE SUR DEMANDE

Représentant : **R. CHAMOUSSET**, 8, rue Nicolas-Charlet, **PARIS-XV**

CRÉSYL-JEYES

DÉSINFECTANT ANTISEPTIQUE

EMPLOYEZ LE " JEYES "

Produit très imité, jamais égalé. Action rapide et constante

La PUISSANCE ANTISEPTIQUE du CRÉSYL-JEYES est DIX FOIS plus grande
que celle du Crésylol à 50 % de Crésol.

FABRICATION SPÉCIALE ET EXCLUSIVE RÉFÉRENCES ET PRIX SPÉCIAUX AUX ADMINISTRATIONS

PRODUITS SANITAIRES ET ANTISEPTIQUES

18, Rue Charles-Bassée, FONTENAY-SOUS-BOIS (Seine) Tél. : TREMBLAY 05-17

COGIT

36, BOULEVARD SAINT-MICHEL, PARIS — Tél. : Danton 65-37.

MICROSCOPES

MICROTOMES

ÉTUVES

CENTRIFUGEURS

HÉMOLEUCOMÈTRE COSTIL-FLAD

MANUFACTURE DE GRILLAGES ET TOLÉRIE

CAGES POUR ÉTUDES BACTÉRIOLOGIQUES

**SOCIÉTÉ DES
ÉTABLISSEMENTS**

PIARRETTE

**FONDÉS
EN 1905**

Société à Responsabilité Limitée au Capital de 300.000 Francs

SERVICE COMMERCIAL : 17, RUE DES GRANDS-AUGUSTINS, PARIS-6^e

C. C. Postaux : Paris 1361-76

TÉL. : DANTON 97-75

Reg. Com. Seine 201.124 B

Fournisseur de l'Institut Pasteur et de la Faculté de Médecine.

FOURNITURES POUR LABORATOIRES

VERRERIE GÉNÉRALE

Verre ordinaire, Bohème, Pyrex

Verrerie soufflée et graduée

Aérométrie. Densimétrie

Thermométrie — Porcelaine

Papiers à filtrer - Caoutchouc

Appareillage

TOUTES PIÈCES SUR CROQUIS

CHOLIN & C^{IE}

39-41 RUE DES CLOYS, PARIS (18^e)

Tél. : Montmartre 61-81

Catalogue Général sur demande

Ancienne Maison WIESNEGG (1831-1892)
» » P. LEQUEUX (1892-1918)
» » R. LEQUEUX (1918-1948)

Ét^s LEQUEUX

S. A. R. L.

64, Rue Gay-Lussac - PARIS-5^e

Télégr. : Wiesnegg-Paris-38 Tél. : ODEON 06-25
R. C. Seine 340.141 B

**AUTOCLAVES
ALAMBICS
ÉTUVES - BAINS-MARIE
FOURS - BRULEURS**

Matériels de :
**STÉRILISATION
DÉSINFECTION
TRAITEMENT DU LAIT**

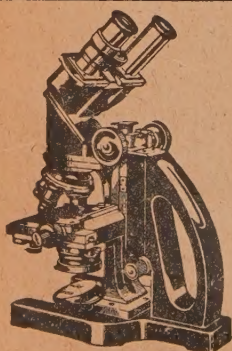
APPAREILS SPÉCIAUX SUIVANT PLANS

FILTRE CHAMBERLAND SYSTÈME PASTEUR

80 BIS, RUE DUTOT — PARIS-XV^e VAUGIRARD 26-53

**LE SEUL FILTRE MIS AU POINT DANS LE LABORATOIRE DE PASTEUR
ET AUTORISÉ PAR LUI A PORTER SON NOM**

===== **STÉRILISATION A FROID** =====
**APPLICATION PARTICULIÈRE A L'ÉPURATION DES EAUX
BOUGIES SPÉCIALES POUR L'USAGE DU LABORATOIRE**



MAISON VERICK-STIASSNIE

STIASSNIE FRÈRES

Constructeurs

**67, Boulevard Auguste-Blanqui, 67
PARIS**

MICROSCOPES

MICROTOMES



CHARLES DOPTE
(1878-1950)

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

CHARLES DOPTER

(1878-1950)

Lorsqu'on a connu la clarté d'esprit, la puissance d'action et de travail, le courage civique et l'intrépidité de Charles Dopter, on ne peut se défendre d'une émotion douloureuse à la pensée qu'il n'est plus.

Cet homme fort reste cependant parmi nous, il laisse un message inscrit dans son œuvre scientifique, dans les traditions qu'il a instaurées ou maintenues, dans le don de lui-même à la Science, à notre Institution, au corps de Santé militaire.

L'œuvre de Ch. Dopter a, dans le domaine de la microbiologie, de l'épidémiologie, de l'hygiène et de la clinique des maladies infectieuses, un caractère homogène et construit, qu'expliquent la personnalité du savant, ainsi que les résonances réciproques de ses activités scientifiques et médico-militaires. Ch. Dopter disposait d'une acuité de pensée et d'une rigueur de technique qui expliquent son orientation vers la bactériologie et l'anatomopathologie ; ce versant de sa personnalité s'articulait avec une aptitude à la généralisation et à la connaissance des grands plans des problèmes scientifiques qui, renforcées par sa qualité de médecin militaire appelé à confronter les collectivités humaines avec les agents pathogènes, le conduisirent vers l'épidémiologie et vers l'hygiène. Son caractère net et droit et son sens des responsabilités formèrent l'officier et l'administrateur.

Charles Dopter, issu d'une lignée de Parisiens de Paris, naquit lui-même à Paris le 12 février 1873. Entré à l'Ecole du Service de Santé militaire de Lyon en 1893, il prit son grade de Docteur en Médecine en 1896 et sortit de l'Ecole d'Application du Service de Santé du Val-de-Grâce, quatrième de sa promotion, en 1897.

Son orientation vers la microbiologie, dont la destinée prodigieuse s'affirmait, et vers l'épidémiologie, était déjà évidente pendant son stage d'officier-élève, et, jeune aide-major, il fut affecté au Laboratoire de Bactériologie du Val-de-Grâce. Admis au Concours d'agrégation du Val-de-Grâce en 1903, il prit, en charge, de 1904 à 1908, le laboratoire de bactériologie, le Service des maladies contagieuses de cet hôpital et l'enseignement relatif aux maladies et épidémies des armées.

Remarqué par Monsieur Roux, il est appelé en 1910 à l'Institut Pasteur, où un laboratoire lui sera affecté, et où il participera aux recherches et à l'enseignement du Cours supérieur de Microbiologie, tout en conservant son activité médico-militaire.

Nommé Professeur à l'Ecole d'application du Service de Santé militaire du Val-de-Grâce (Chaire des maladies et épidémies des Armées), en 1913, il est envoyé, dès le début de la Guerre de 1914-1918, en mission spéciale au Grand Quartier Général, à Chantilly, pour toutes les questions techniques concernant l'hygiène, l'épidémiologie et la prophylaxie des maladies infectieuses ; il assumera cette charge écrasante avec une compétence, un allant, une efficacité et une autorité, unanimement reconnus, jusqu'à l'armistice de novembre 1918.

Elu Membre de l'Académie de Médecine dans la section d'Hygiène en 1918, il est appelé en 1920 à cette belle chaire d'épidémiologie du Val-de-Grâce qui est le couronnement des grandes carrières médicales militaires.

Directeur du Service de Santé de l'Armée française d'occupation en Allemagne, Directeur de l'Ecole d'Application du Service de Santé militaire, Directeur du Gouvernement militaire de Paris en 1928, il accède enfin, en 1930, au sommet des responsabilités et de la hiérarchie en prenant la direction du Service de Santé du Ministère de la Guerre (7^e Direction) et reçoit la dignité de Grand Officier de la Légion d'honneur. En 1935, Charles Dopter entre dans le cadre de réserve des Officiers généraux et, en 1937, il est appelé au Conseil d'Administration de l'Institut Pasteur. Charles Dopter ignorait le sens du mot retraite.



L'œuvre scientifique de Dopter est assise sur trois bases majeures : 1^o l'identification des quatre types de méningocoques et la préparation des sérums anti-méningococciques polyvalents et

électifs ; 2° l'épidémiologie et l'anatomie pathologique de la dysenterie amibienne ; 3° la démonstration du pouvoir pathogène expérimental des bacilles dysentériques, l'étude de l'entérotropisme et du neurotropisme de l'extrait de ces bacilles, la préparation du sérum antidysentérique Shiga, à l'Institut Pasteur.

Les travaux de Dopter sur les méningococcies ont pour origine la mission en Allemagne que lui confia, en 1910, Emile Roux pour confronter les travaux de l'Institut Pasteur sur les méningocoques avec ceux de l'Institut Bactériologique de Berlin, confrontation pertinente et fructueuse. Dès son retour en France, Dopter, partageant à l'Institut Pasteur, avec Salimbeni, un laboratoire de recherches, montre d'abord que toutes les souches de méningocoques ne sont pas agglutinées par un même anti-sérum, puis il établit avec Pauron — notion fondamentale — qu'il existe quatre types de méningocoques : un méningocoque et des para-méningocoques α , β et γ qui deviendront les méningocoques A, B, C et D de la classification de Nicolle, Debains et Jouan. Considérant le problème sur le plan thérapeutique et pratique, il montre que, pour être efficace, le sérum à utiliser contre la méningite cérébro-spinale doit correspondre au type de méningocoque que l'on veut combattre et il prépare à l'Institut Pasteur un sérum anti-méningococcique polyvalent et des sérums anti-méningococciques A, B et C ; il met ainsi à la disposition des malades et des médecins une médication efficace, au moment où la sérothérapie anti-méningococcique subissait de vives critiques, justement du fait d'une inégalité d'action résultant de la diversité des souches. C'est encore à lui que l'on doit la découverte de la présence des méningocoques dans le rhino-pharynx des convalescents et de certains porteurs sains et son importance épidémiologique.

Les travaux de Dopter sur les méningococcies sont regroupés dans deux de ses ouvrages devenus classiques : « L'infection méningococcique » (1921) et « Le traitement de la méningite cérébro-spinale » (1936).

Au début de ce siècle, la dysenterie amibienne — le terme d'amibiase n'était pas encore créé — apparaissait classiquement comme une maladie strictement exotique. Dopter en diagnostiqua plusieurs cas parmi ses malades métropolitains et coloniaux du Val-de-Grâce et, en 1904, il montra le *premier*, qu'il peut exister en France une amibiase autochtone. Lorsque apparaîtra, pendant la « Grande Guerre », en 1915, l'épidémie d'amibiase intestinale, si bien étudiée par P. Ravaut, qui se développa dans les contingents militaires en contact avec des troupes coloniales, pendant la campagne des Flandres, Dopter n'en sera pas surpris.

L'épidémiologie, l'anatomie pathologique, la clinique, la thérapeutique et la prophylaxie de l'amibiase, dont il avait une connaissance très approfondie, bénéficièrent de ses recherches ; il montra,

en particulier, la différence fondamentale qui existe entre l'ulcération profonde, suppurative et décollée, en « bouton de chemise », de la dysenterie amibienne et l'ulcération superficielle, érosive et abrasée de la dysenterie bacillaire ; il établit que la pénétration de l'amibe dysentérique à travers la muqueuse intestinale peut se faire, soit par cheminement dans les glandes de Lieberkuhn, soit à travers les *fascia* périglandulaires ; il démontra expérimentalement le tropisme de l'amibe dysentérique pour la bilirubine, et les relations possibles de cet acte biologique avec les localisations hépatiques de la maladie ; il fut, avec C. Mathis, en particulier, parmi les auteurs qui établirent le rôle de la flore bactérienne associée à l'amibe dysentérique dans la pathogénie de l'amibiase.

L'étude de la dysenterie amibienne conduisit Dopter à celle de la dysenterie bacillaire. Il établit d'abord expérimentalement avec Vaillard le rôle pathogène du bacille de Shiga chez le lapin et chez le chien ; il vit que le bacille injecté sous la peau ou dans les veines, chez l'animal, détermine des lésions inflammatoires et ulcéreuses au niveau du gros intestin et des altérations nécrotiques de la substance grise du système nerveux ; il montra que les bacilles tués par la chaleur ou le chloroforme ont le même pouvoir pathogène que les bacilles vivants et que ceux-ci contiennent une toxine. En outre, Dopter démontra avec Repaci, en 1909, que la dysenterie bacillaire peut être conférée expérimentalement au lapin par ingestion de bacilles de Shiga.

Devant la tendance qui sévissait alors de démembrer l'étiologie des dysenteries bacillaires, Ch. Dopter réagit et sut faire admettre que tous les agents étiologiques de la dysenterie bacillaire appartiennent à un même groupe, celui des bacilles dysentériques, comprenant un bacille dysentérique vrai, toxique, le bacille de Shiga isolé par Chantemesse et Widal, en 1888, et bien étudié par Shiga, ultérieurement, et un sous-groupe contenant les bacilles de Flexner, de Hiss et de Strong. Le sérum anti-dysentérique Shiga, de l'Institut Pasteur, fut préparé au laboratoire de Dopter ; c'est lui qui en fixa la technique de préparation, les indications curatives et préventives, et la posologie.

En dehors de cette œuvre fondamentale, on doit aussi à Dopter d'importantes données acquises avec la collaboration de Sicard et Repaci, en 1905, sur l'infection ourlienne, le cyto-diagnostic des oreillons et la méningite lymphocytaire ourlienne.

L'enseignement de Charles Dopter et sa contribution au mouvement médical contemporain dans le domaine de la pathologie infectieuse et de la microbiologie sont condensés dans deux ouvrages classiques : « Le Traité d'Epidémiologie » qu'il écrivit avec de Lavergne, inspiré de son cours du Val-de-Grâce, et un « Précis de Bactériologie » rédigé avec la collaboration de

Sacquépée. Dopter écrivit, en outre, les articles sur la méningococcie, sur la dysenterie amibienne et sur la dysenterie bacillaire publiés dans le « Traité de Médecine » de Vidal, Roger et Teissier.

Son souci de la protection de la santé du soldat, joint à sa disposition naturelle de prendre une large vue des problèmes sanitaires le conduisirent à publier, en collaboration avec Rouget, en 1906, un « Traité d'Hygiène alimentaire » et en 1907, un « Traité d'Hygiène militaire » dont les bases sont demeurées.

Travailleur sans renoncement, Dopter avait achevé, quelques mois avant sa fin, un traité de l'amibe dysentérique et de l'amibiase, rédigé en collaboration avec nous-mêmes, qui sera présenté dans peu de temps aux médecins et aux biologistes.



Dans le privé, Ch. Dopter était concis, objectif, gai et d'une simplicité supérieure qui imposait l'attention et la considération. Dans le Service, son sentiment des responsabilités et des devoirs de sa charge entraînait de sa part de légitimes exigences, toujours pondérées, d'ailleurs, par son esprit d'équité, son non-conformisme et une notion du relatif qu'apportait sa connaissance étendue des sciences expérimentales et de leurs disciplines.

Le livre d'une vie si pleine et si droite n'est pas fermé, la pensée et l'enseignement de Charles Dopter restent présents dans son œuvre et dans ses exemples et ceci est le réconfort de ceux qui furent ses amis, ses collaborateurs et ses élèves.

**STABILITÉ DES TYPES BACTÉRIOPHAGIQUES
DE *SALMONELLA PARATYPHI* B
ET VALEUR ÉPIDÉMIOLOGIQUE DE LA LYSOTYPIC
PAR LA MÉTHODE DE FELIX ET CALLOW**

par P. NICOLLE, A. JUDE et R. BUTTIAUX (*).

(Institut Pasteur de Paris [Service du Bactériophage].
Laboratoire central de Bactériologie de l'Armée et Institut Pasteur
de Lille.)

Depuis Sonnenschein (1925, 1928), on s'est efforcé de trouver, pour de nombreuses bactéries, des bactériophages permettant, par leur diversité d'action, de classer les souches d'une même espèce en types nettement définis.

Dans la pratique, les résultats furent souvent décevants : les bactériophages séparaient parfois des échantillons recueillis dans un même foyer épidémique, alors qu'ils se montraient incapables. au contraire, dans d'autres cas, d'indiquer des différences entre des souches de provenances variées.

Craigie et Yen (1938), mirent à profit le remarquable pouvoir d'adaptation d'un bactériophage, le phage II, actif exclusivement sur les bacilles typhiques possédant l'antigène Vi. Ils obtinrent, en régénérant ce phage sur un certain nombre de bacilles, des « préparations bactériophagiques » douées chacune d'un haut degré de spécificité vis-à-vis de l'un des divers types de l'espèce *Salmonella typhi*. Pratiquement, tous les bacilles fraîchement isolés de l'organisme sont riches en antigène Vi. Rares sont donc ceux qui ne peuvent pas être caractérisés.

Actuellement, on compte 24 types et sous-types : A, B₁, B₂, B₃, C, D₁, D₂, D₄, D₅, D₆, E₁, E₂, F₁, F₂, G, H, J, K, L₁, L₂, M, N, O et T.

Le très grand intérêt de la méthode réside dans le fait que les types ainsi individualisés sont stables (1) : le type du bacille isolé chez un individu (malade, convalescent, porteur de germes)

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} juin 1950.

(1) La stabilité des types bactériophagiques de *S. typhi* est en effet bien établie. Cependant, on admet qu'il puisse y avoir parfois passage d'un sous-type à un autre sous-type, par exemple de E₁ en E₂ ou inversement. Cette éventualité doit être malgré tout assez rare (Craigie et Felix, 1947).

se retrouvera pour tous les bacilles recueillis chez les malades contaminés par ce dernier. La détermination des types bactériophagiques, ou *lysotypie* (2) est donc un précieux auxiliaire pour l'épidémiologiste. Elle permet de suivre la filiation des cas, de déceler l'existence de plusieurs foyers dans une région d'endémicité typhoïdique, d'établir la responsabilité d'un porteur de germes dans l'apparition de plusieurs cas groupés (3). Sa valeur épidémiologique a été amplement démontrée par les beaux travaux de Craigie, de Felix, de Desranleau et de leurs collaborateurs et par les publications d'un grand nombre d'épidémiologistes. La lysotypie de *S. typhi* est maintenant appliquée officiellement en Angleterre, au Canada, aux Etats-Unis et dans quelques autres pays (4).

Felix et Callow (1943) ont mis au point une méthode de « lysotypie » de *Salmonella paratyphi* B se réclamant du même principe. Les « lysotypes » Vi de cette espèce sont beaucoup moins nombreux que ceux de *S. typhi*. Actuellement, on en admet 8, plus 1 groupe : ce sont les types 1, 2, 3 a, 3 a I, 3 b, Beccles, Taunton, Dundee et le groupe Z comprenant les bacilles non caractérisables [Felix et Callow, 1950] (5).

Les pourcentages de fréquence des types de *S. paratyphi* B, calculés non d'après le nombre des cultures lysotypées, ni celui des cas, mais d'après le nombre des « foyers d'infection », en

(2) La détermination des types bactériophagiques au moyen de bactériophages spécifiques est connue, dans les textes anglo-saxons, sous le nom de « phage-typing ». Les auteurs de langue française, s'ils veulent éviter une longue périphrase écrivent parfois « typage » ou « typation ». Ces termes sont disgracieux. Ils laissent ignorer, au surplus, que l'opération se fait au moyen des bactériophages.

Nous proposons donc le mot nouveau de *lysotypie*. Le radical « lyso » implique l'idée du bactériophage, par exemple dans « lysogène » (qui donne naissance à un bactériophage), d'où l'on a tiré « lysogénéité » ou « lysogénie » (fonction d'une bactérie lysogène), « lysosensible » et « lysorésistant » (qui subit l'action lytique d'un bactériophage ou qui lui échappe), etc. Cette habitude vient sans doute de ce que les bactériophages sont appelés par certains auteurs « principes ou agents lytiques » (Bordet, Wollman). La « lysotypie » signifie donc la « typie » (c'est-à-dire la détermination des types) par les bactériophages.

(3) Cf. G. Renoux. *Voir bibl.*

(4) Cf. P. Nicolle et A. Jude. *Voir bibl.*

(5) Le Comité international de la lysotypie de *S. typhi* et *S. paratyphi* B, qui doit se réunir à Rio-de-Janeiro en août 1950, à l'occasion du Congrès International de Microbiologie, examinera la reconnaissance éventuelle de plusieurs nouveaux types non encore officiels, parmi lesquels le type Dundee, mentionné ici, et les types B. A. O. R. et Newburn pour *S. paratyphi* B et les types 25 (Lie), 26 (Clark), 27 (Scholtens), 28 (Scholtens) et 29 (Borman) pour *S. typhi*.

France pendant les douze mois écoulés entre le 1^{er} mai 1949 et le 30 avril 1950, ont été les suivants :

Type 1 : 1,4 ; type 2 : 0 ; type 3a : 0,35 ; type 3aI : 1,4 ; type 3b : 0,35 ; type Beccles : 9 ; type Taunton : 43 ; type Dundee : 43 ; groupe Z (cultures non caractérisables) : 1,5.

On le voit, le nombre des cultures non caractérisables a été remarquablement faible (1,5 p. 100). Cependant nos résultats avaient été assez peu encourageants au début : presque toutes les cultures soumises à la lysotypie avaient dû être considérées comme non caractérisables (groupe Z). Il est vrai que nous ne disposions à cette époque que des 5 premiers phages, pourtant suffisants pour la presque totalité des cultures isolées en Grande-Bretagne. La situation changea dès que nous reçûmes les phages Vi Beccles et Taunton que le D^r Felix et miss Callow nous envoyèrent aimablement en mai 1949, bien qu'ils n'eussent pas encore publié leur schéma de lysotypie avec ces nouveaux phages. Malgré une amélioration évidente, il restait encore une proportion trop considérable de cultures non caractérisables. Un grand nombre de ces dernières, provenant des régions les plus diverses de France, furent envoyées alors à Londres et la presque totalité de ces cultures furent reconnues par les auteurs de la méthode, comme appartenant à un nouveau type, le type Dundee, dont le phage spécifique n'avait pas encore été distribué. Donc, sans l'utilisation des 3 nouveaux phages (Beccles, Taunton et Dundee), la presque totalité des cultures isolées en France au cours de l'endémo-épidémie de 1949-1950 n'eût pu être lysotypée.

Les résultats annoncés par Felix et ses collaborateurs établissent d'une manière incontestable que la valeur épidémiologique de cette nouvelle méthode ne le cède en rien à celle de la méthode de Craigie. Cependant, les publications qui lui ont été consacrées jusqu'à présent sont encore peu nombreuses et nous pensons qu'il n'est pas sans intérêt d'apporter, au sujet de la parfaite stabilité des types, notre contribution personnelle. Celle-ci s'appuie sur une expérience comprenant environ 1.500 cultures de *S. paratyphi* B, isolées au cours de l'endémo-épidémie importante qui sévit en France depuis plus d'un an. Nous ne pouvons donner ici que nos conclusions. Un mémoire comportant les détails de nos résultats sera publié ailleurs.

1° INVARIABILITÉ DU TYPE BACTÉRIOPHAGIQUE DES DIVERSES CULTURES ISOLÉES CHEZ UN MÊME MALADE. — Très souvent, nous avons pu « lysotyper » un certain nombre de cultures isolées chez un même individu au cours de l'évolution de sa maladie et de sa convalescence. Quel qu'ait été le mode d'isolement (hémoculture, coproculture, culture de l'urine, culture de la bile, etc.), le type des différents bacilles est resté le même. Ces observations

concernent les types Dundee, Taunton et Beccles, qui sont le plus fréquemment rencontrés en France actuellement. L'occasion nous a manqué, en raison de leur rareté relative, de vérifier le même fait pour les autres types.

Il ne s'est présenté à la règle de l'invariabilité du type chez un même malade, qu'une seule série d'exceptions : c'est lorsqu'une culture, isolée généralement des selles, était contaminée par un bactériophage (6). On s'en apercevait presque toujours par la présence de plages dans la couche bactérienne en dehors des limites atteintes par l'étalement des gouttes des bactériophages-type. La culture contaminée n'appartenait plus au même type que les autres cultures provenant de ce malade. Elle entraînait dans le groupe Z, c'est-à-dire qu'elle n'était lysée que par le bactériophage anti « O », qui n'est spécifique d'aucun type, et parfois elle se montrait même insensible à ce phage.

Mais il suffisait de la débarrasser de son bactériophage de contamination par quelques repiquages sur une gélose un peu sèche ou en la cultivant en présence de formol pour qu'elle donnât à son tour les réactions du type auquel appartenaient les autres souches du même malade.

2° PERMANENCE DU TYPE DU BACILLE PARATYPHIQUE B CHEZ LES PORTEURS DE GERMES PENDANT TOUTE LA DURÉE DU PORTAGE. — Le bacille de chaque malade devenu porteur de germes, dans toutes nos observations, appartenait au même type que les bacilles isolés au cours de la maladie.

Des malades devenus porteurs, ainsi que des porteurs sains, sans antécédents connus d'infection paratyphoïdique, furent suivis pendant plusieurs mois et, dans plusieurs cas, pendant plus d'un an. Le type des bacilles isolés au cours de leur portage n'a jamais subi de changement. Il s'agissait notamment des types 1, Taunton, Beccles et Dundee.

3° STABILITÉ DU TYPE BACTÉRIOPHAGIQUE de *S. paratyphi* B DANS UN MÊME FOYER ÉPIDÉMIQUE. — Chaque fois qu'un foyer épidémique bien délimité a été étudié, tous les malades fournissaient des souches d'un même type.

Premier exemple : Dans le département du Nord, au cours de l'été

(6) Il ne faut pas confondre cette contamination « accidentelle », généralement facile à guérir, d'une culture par un bactériophage avec la lysogénité, fréquente chez *S. paratyphi* B (Nicolle, Grabar et Gibert, 1946) qui est la propriété permanente, potentielle ou effective, d'émettre du bactériophage dans le milieu. Une telle culture n'est pas, dans les conditions normales, sensible à son propre bactériophage. Aucun procédé, d'après F. M. Burnet (*voir bibl.*), ne peut lui faire perdre sa fonction lysogène.

1949, 3 localités assez voisines furent atteintes par la fièvre paratyphoïde :

A Bailleul, il s'agissait d'une importante épidémie dans un asile de femmes aliénées. 62 souches de *S. paratyphi* B furent isolées. Toutes appartenaient au type Taunton, à l'exception d'une seule culture provenant d'une malade qui avait déjà fourni 4 cultures du type Taunton. Cette culture aberrante donnait les réactions du groupe Z. Elle était contaminée par un bactériophage et après l'un des traitements mentionnés plus haut, elle est rentrée dans la norme.

Huit souches furent recueillies dans le petit groupement épidémique d'Orchies. Toutes étaient du type Dundee.

Enfin, à Saint-Amand, sur 8 souches isolées, 7 furent classées dans le type Beccles. La huitième était sous la forme « rough » et, de ce fait, ne pouvait pas être caractérisée par les bactériophages.

Voilà donc, à quelques vingtaines de kilomètres de distance, de nombreux cas qui sont apparus presque simultanément. Ces cas sont-ils dus à l'extension d'un foyer épidémique commun ? Non, car la lysotypie a permis de conclure à l'existence de 3 foyers distincts n'ayant aucune relation entre eux, en dehors, bien entendu, des facteurs météorologiques communs, notamment la grande sécheresse de l'été 1949.

Notons qu'à la même époque, dans une grande ville comme Lille, on trouvait simultanément 4 types bactériophagiques de *S. paratyphi* B : les types 1, Beccles, Taunton et Dundee.

Deuxième exemple : Près de Bordeaux, une importante épidémie dans un camp militaire survenue en juin 1949 chez des recrues non encore vaccinées, a permis d'isoler 36 souches. Toutes étaient du type Dundee. Quelque temps auparavant un petit foyer épidémique avait fait son apparition dans la population civile de Bordeaux. Les 15 souches recueillies appartenaient également au type Dundee.

Troisième exemple : *Contamination familiale*. — L'enfant B... est soigné au Val-de-Grâce en octobre 1946 pour une fièvre paratyphoïde. Deux cultures sont isolées, l'une par hémoculture, l'autre par coproculture. Toutes les deux sont du type Taunton. Le père, manifestement contaminé par l'enfant, est hospitalisé à son tour en novembre 1946. Une hémoculture permet d'isoler un bacille du type Taunton.

Quatrième exemple : Le militaire V... entre au Val-de-Grâce pour une fièvre paratyphoïde en mai 1947. Son bacille isolé par coproculture est du type Beccles. Après guérison, il reste porteur de germes (coproculture = b. paratyphique B, type Beccles). Ce militaire était tombé malade après une permission passée auprès de sa femme dont il est habituellement éloigné. Une coproculture faite chez cette dernière a montré la présence d'un bacille paratyphique B, type Beccles. M^{me} V... avait fait une fièvre paratyphoïde B en août 1946. Elle était donc restée porteuse de germes et avait contaminé son mari.

Cinquième exemple : En 1947, 5 personnes de la famille L... sont atteintes de fièvre paratyphoïde à la suite de l'ingestion de radis. Seule la mère, qui n'en avait pas mangé, échappe à la contamination. Le père et ses deux fils sont hospitalisés au Val-de-Grâce. Hémocultures et coprocultures pratiquées chez ces 3 malades permettent d'isoler 5 cultures de b. paratyphique B, toutes de type Dundee.

Nous pourrions multiplier à l'infini les exemples d'épidémies de famille, de collège, de caserne, de village, de quartier : dans chaque foyer, les bacilles isolés se classaient dans le même type bactériophagique.

4° INVARIABILITÉ DU TYPE BACTÉRIOPHAGIQUE AVANT, PENDANT ET APRÈS LE TRAITEMENT PAR LA CHLOROMYCÉTINE. — Dans la majorité des cas, les hémocultures et les coprocultures des malades atteints de fièvre paratyphoïde B deviennent négatives dès le début de l'administration de la chloromycétine. Le bacille demeure indécélable pendant toute la durée du traitement et, en général, il ne reparait plus.

Mais il arrive que les coprocultures restent positives pendant plusieurs jours. Dans d'autres cas, elles ne cessent pas de l'être, ou bien après une période plus ou moins longue de négativité, elles révèlent à nouveau la présence du bacille dans l'intestin sans que l'état du malade en soit affecté. Enfin, il survient parfois des rechutes avec réapparition du germe dans le sang et dans les selles.

Nous nous sommes demandé ce qu'il advenait du type bactériophagique de ces divers bacilles ayant subi l'action de la chloromycétine *in vivo*. Nous ne disposons encore que d'une dizaine d'observations ; mais les résultats en sont très nets : dans tous les cas, y compris celui d'un malade resté porteur de germes après une rechute et un deuxième traitement à la chloromycétine (7), le type bactériophagique est demeuré invariable. Il s'agissait des types 1, Taunton et Dundee.

5° STABILITÉ DES TYPES BACTÉRIOPHAGIQUES DES CULTURES SOUMISES A UNE SÉVÈRE SÉLECTION « IN VITRO ». — Les cultures issues de colonies isolées d'une souche de *S. paratyphi* B se comportent, vis-à-vis de l'action lytique des bactériophages paratyphiques type, d'une manière parfaitement homogène. On ne trouve jamais, chez cette espèce, les différences de lysosensibilité qui apparaissent si souvent parmi les colonies d'une même souche de *S. typhi* soumises à la lysotypie par les bactériophages typhiques Vi (Nicolle, Jude et Le Minor, 1950).

Mais le choix de colonies, même nombreuses, sur une plaque de gélose, n'est pas un moyen suffisant pour l'obtention de mutants éventuels différents dans leur lysosensibilité.

Nous avons donc utilisé divers procédés de sélection ne laissant subsister qu'une très faible proportion d'éléments bactériens.

(7) Malade de l'hôpital Claude-Bernard, service du professeur Mollaret. Nous adressons nos remerciements au professeur Mollaret pour avoir bien voulu nous permettre de recueillir des renseignements épidémiologiques chez les malades de son service.

a) *Vieillessement et dessiccation.* — Des cultures, sur gélose inclinée, de *S. paratyphi* B, appartenant aux types 1, Beccles, Taunton et Dundee, ont été laissées, sans capuchon de caoutchouc, à la température du laboratoire, pendant six mois. A ce moment, la gélose était racornie en une mince pellicule ambrée. Après addition d'eau peptonée et séjour de vingt-quatre heures à l'étuve, les quelques bacilles restés vivants ont proliféré. Après vérification de la pureté des cultures, on en a déterminé le type. Chacune de ces cultures, ainsi vieilles et desséchées, avait gardé son type initial.

b) *Sélection par chauffage à 60° C.* — Des suspensions en eau peptonée de cultures des types 1, Beccles, Taunton et Dundee, sont chauffées au bain-marie à 60° C pendant des temps variant de cinq à trente minutes. La diminution du nombre des germes vivants est très importante puisque au lieu de donner des cultures en nappe continue sur boîte de gélose comme elles le faisaient avant le chauffage, les suspensions chauffées ne fournissent plus qu'un nombre réduit de colonies (de 100 environ à quelques unités). Les cultures obtenues à partir de ces colonies isolées appartiennent aux types bactériophagiques respectifs des souches avant le chauffage (8).

c) *Sélection par la streptomycine.* — Au centre d'une boîte de gélose préalablementensemencée avec *S. paratyphi* B, type 1, on dépose 1 goutte d'une solution faible de streptomycine. Après quarante-huit heures d'étuve à 37° C, la zone centrale, qui reste dénudée par suite de l'effet antibiotique de la streptomycine, se montre bordée de deux ou trois rangées d'assez grosses colonies streptomycino-résistantes. Ces colonies donnent des cultures du type 1.

Dans d'autres expériences portant toujours sur une souche du type 1, la culture répétée à plusieurs reprises sur un milieu à la streptomycine, n'a pas fait changer le type bactériophagique, tandis que le degré de streptomycino-résistance a augmenté dans des proportions considérables.

Plusieurs tentatives pour obtenir des mutants chloromycétino-résistants par le même procédé ont échoué. La culture prélevée à l'extrême limite de l'action antibiotique compatible avec la survie de quelques germes avait gardé le même type que la culture initiale (9).

(8) Notons seulement que, dans quelques cas, les réactions secondaires, c'est-à-dire les réactions avec les phages non spécifiques du type envisagé, ont été différentes de ce qu'elles étaient pour les cultures initiales, ce qui semble indiquer l'existence d'une mutation (spontanée ou induite) dont le chauffage serait le moyen de mise en évidence.

(9) Ces expériences ont été faites, à notre demande, par E. Edlinger dans le service du Bactériophage de l'Institut Pasteur.

d) *Sélection par le formol*. — Les germes survivant à l'action du formol sur boîte de gélose conservent le type bactériophagique auquel appartenait la souche (type Taunton).

e) *Sélection par les bactériophages*. — Des cultures des types 1, Beccles, Taunton et Dundee ont été soumises à l'action de plusieurs bactériophages de notre collection, notamment les bactériophages typhique 105 et paratyphique B (Cayot). Les cultures secondaires, soit sous la forme d'une couche à peu près continue, soit sous celle de colonies isolées, ont été prélevées et leur type a été déterminé. Les résultats de la lysotypie ont été, dans cette série d'expériences, très variables. Parfois, il n'y avait aucun changement de type, mais le plus souvent la souche est devenue insensible à tous les phages-type y compris les phages anti-« O », ou bien elle n'était lysée que par ce dernier. Dans ce cas, elle était classée dans le groupe Z.

CONCLUSIONS.

Les types bactériophagiques de *S. paratyphi* B sont d'une très grande stabilité : les bacilles isolés chez un même malade, chez un même porteur de germes, dans un même foyer épidémique, quel que soit le mode d'isolement, appartiennent toujours au même type.

Le traitement par la chloromycétine, lorsque le germe persiste ou s'il réapparaît dans les selles, avec ou sans rechute clinique, est sans influence sur le type.

Diverses expériences de sélection *in vitro* (vieillessement, dessiccation, chauffage, streptomycine, formol) montrent que la stabilité du type bactériophagique résiste à ces actions brutales.

Seuls, certains bactériophages non spécifiques peuvent rompre cette stabilité en rendant les cultures moins sensibles ou totalement réfractaires aux bactériophages spécifiques des types.

Ces résultats confirment, s'il en est besoin, la grande valeur épidémiologique de la méthode de Felix et Callow.

Nous remercions très vivement le professeur A. Felix et miss B. R. Callow (Londres) de nous avoir fourni les bactériophages-type, d'avoir bien voulu prendre la peine de pratiquer pour nous la détermination du type Dundee, pour lequel nous ne possédons pas encore le phage spécifique, et de nous avoir autorisés à publier les résultats de cette détermination.

En dehors des germes isolés par l'un ou l'autre d'entre nous (A. J. et R. B.), nous avons reçu des souches et des renseignements épidémiologiques de nombreux collègues. Nous adressons nos vifs remerciements, en particulier au Dr Reilly et au Dr Tournier (Hôpital Claude-Bernard, Paris) et à M^{lle} Mousset (Hôpital Pasteur).

BIBLIOGRAPHIE

- BURNET (F. M.). *J. Path. a. Bact.*, 1932, **35**, 851 ; *Austral. J. exp. Biol. a. Med.*, 1929, **6**, 277.
- CRAIGIE (J.) et FELIX (A.). *Lancet*, 1947, **1**, 823.
- CRAIGIE (J.) et YEN (C. H.). *Canad. Publ. Health. J.*, 1938, **29**, 448.
- DESBRANLEAU (J. M.). *Canad. Publ. Health. J.*, 1947, **37**, 343 ; 1950, **41**, 128.
- DESBRANLEAU (J. M.) et MARTIN (I.). *Canad. Publ. Health. J.*, 1950, **41**, 38.
- FELIX (A.). *Brit. med. Bull.*, 1944, **2**, 269.
- FELIX (A.) et CALLOW (B. R.). *Brit. med. Bull.*, 1943, **2**, 127.
- FELIX (A.) et CALLOW (B. R.). *J. Hyg. Camb.*, 1950 (à paraître).
- HUTCHINSON (J. R.). *Brit. med. J.*, 31 juillet 1943, 130.
- IRVINE (E. D.) et GALVIN (T. G.). *Lancet*, 1949, **257**, 904.
- JUDE (A.) et NICOLLE (P.). *Ces Annales*, 1949, **77**, 550.
- MARTIN (P. H.). *Month. Bull. Min. Health. a. Publ. Health. Labo. Serv.*, 1947, 148.
- NICOLLE (P.), GRABAR (J.) et GIBERT (P.). *Ces Annales*, 1946, **72**, 81.
- NICOLLE (P.) et JUDE (A.). *La Presse Méd.*, 1949, **57**, 481.
- NICOLLE (P.), JUDE (A.) et LE MINOR (L.). *Ces Annales*, 1950, **78**, 572.
- RENOUX (G.). *Semaine des Hôp.*, 1950, **26**, 1400.
- SONNENSCHN (C.). *Münch. med. Wochenschr.*, 1925, **41**, 1443 ; *Deutsch. med. Wochenschr.*, 1928, n° 25, 103.
- TABBUSH (H.). *Publ. Health.*, 1949, **62**, 81.

EVOLUTION ET CONDITIONS DE STERILISATION DES CULTURES BACTÉRIENNES EN PRÉSENCE DE BACTERIOPHAGES

par R. WAHL et A. TERRADE (*).

(Institut Pasteur.)

Le traitement par les phages des infections de l'homme et des animaux a fait l'objet d'un nombre considérable de travaux, dont les conclusions sont contradictoires. Il s'en dégage, cependant, l'impression que, si le plus souvent on enregistre des échecs, on arrive de temps en temps à modifier favorablement le cours d'une infection spontanée ou expérimentale. On peut consulter à ce sujet des revues de Krueger et Scribner [4], de Morton et Engley [6], et les travaux expérimentaux de Asheshov, Wilson et Topley [1], de Dubos, Straus et Price [2], de Fisk [3], de Morton et Engley [5], de Ward [11].

Aucune tentative n'a été faite jusqu'ici pour déterminer la raison de tous ces échecs et de ces quelques demi-succès. Cependant il est paradoxal que le phage, qui est un agent puissant de destruction des bactéries, soit si peu efficace en thérapeutique, alors que les antibiotiques pour lesquels on trouve dans les souches autant de mutants résistants que pour les phages, donnent d'excellents résultats.

Par ailleurs, au cours d'essais de traitement de l'infection expérimentale de la souris par *Salmonella enteritidis* var. Danysz, qui font l'objet d'une autre publication [10], nous avons fait certaines constatations qui nous ont amenés à penser que l'action du phage devait être étudiée d'un point de vue nouveau. C'est ce que nous essayons de faire dans le présent travail.

Nous avons utilisé une souche de *Salmonella enteritidis*, var. Danysz, provenant du service des vaccins de l'Institut Pasteur, et que nous désignerons sous le nom de souche 2, ainsi que 4 phages : D 4, D 5, D 5 A et T 5. Cette souche et ces phages seront étudiés dans une prochaine publication. Chacun des phages a été préparé sur une des 3 souches 0, 1 et 2 et chaque préparation est désignée par le nom du phage suivi du numéro de la souche, par

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} juin 1950.

exemple D 4/2. Ces préparations avaient été soumises à une purification sommaire préalable par précipitation par CaCl_2 en milieu alcalin (pH 7,8) suivie de filtration. Ce traitement ne fait pas baisser le titre des préparations.

TECHNIQUE. — Des tubes contenant 10 cm³ d'eau peptonée (peptone Uclaf) à 3 p. 100 sontensemencés avec une quantité connue de bactéries, provenant d'une culture sur gélose de dix-huit heures et additionnés d'une quantité déterminée de lysat de titre également connu. Dans chaque expérience un tube témoin reçoit les bactéries seules, un autre uniquement le lysat pour en vérifier la stérilité.

Les numérations de germes sont faites par numération des colonies obtenues sur gélose par étalement d'une dilution appropriée.

Dans les tubes ayant reçu des phages, on fait chaque fois deux numérations. Pour l'une on étale en même temps II gouttes de sérum antiphage, pour l'autre II gouttes de lysat non dilué. La première permet de calculer le nombre total des germes vivants présents dans la culture, la seconde celui des germes résistants. Celui des germes sensibles est donné par différence. L'opacité des cultures est évaluée approximativement en leur attribuant un certain nombre de croix.

On a éprouvé la résistance de la descendance des bactéries qui ont donné des colonies en présence de phages, dans un très grand nombre de cas, en faisant des séries de subcultures. Nous verrons plus loin les déductions qu'on peut en tirer.

L'évolution des cultures en présence de phages est plus ou moins influencée par le nombre de bactéries et de phagesensemencés. Elle présente aussi certaines différences suivant la souche de S. Danysz et la race du phage utilisées. Ces variations ont leur intérêt et nous les décrirons.

Mais nous pensons *que le premier point à mettre en évidence est qu'on peut décrire deux types d'évolution bien distincts suivant qu'il y a ou non stérilisation de la culture*. Nous les étudierons successivement à l'aide de quelques exemples.

PREMIER TYPE D'ÉVOLUTION, SANS STÉRILISATION DE LA CULTURE.

Nous décrirons d'abord un cas bien défini, nous réservant d'indiquer ensuite les différences observées dans d'autres conditions. C'est celui où un nombre moyen de bactéries de la souche 2 est mis en présence d'un grand excès de phages (1 cm³ de lysat D 4/2 pour 10 cm³ de culture). Les deux expériences suivantes en sont des exemples. (Tous les résultats sont exprimés en nombre de phages ou de bactéries par centimètre cube de culture.)

EXPÉRIENCE I. — Ensemencement par centimètre cube : bactéries, 10.000 ; phages, $2,1 \times 10^7$.

TABLEAU I.

TEMPS en heures	SENSIBLES	RÉSISTANTS
1	$6,9 \times 10^3$	0
2	$2,7 \times 10^3$	0
4	$2,2 \times 10^3$	0
5	$2,5 \times 10^3$	0
6	$3,2 \times 10^3$	0
7	$4,8 \times 10^3$	0
8	6×10^3	0
11	2×10^4 env.	0
12	$1,5 \times 10^4$ env.	0
13	$3,4 \times 10^3$	0
14	710	0
16	320	27
17	360	70
18	150	195
19	?	414
20	?	780
24	0	16 millions

Le titrage des bactéries sensibles étant fait par différence, il devient aléatoire quand le nombre des bactéries résistantes est notable et celui des bactéries sensibles très petit. Aussi celui-ci est-il ici indéterminé à partir de dix-neuf heures.

EXPÉRIENCE II. — Ensemencement par centimètre cube : bactéries, 15.000 ; phages, $4,7 \times 10^8$ (tous les chiffres se rapportent à 1 cm³ de culture).

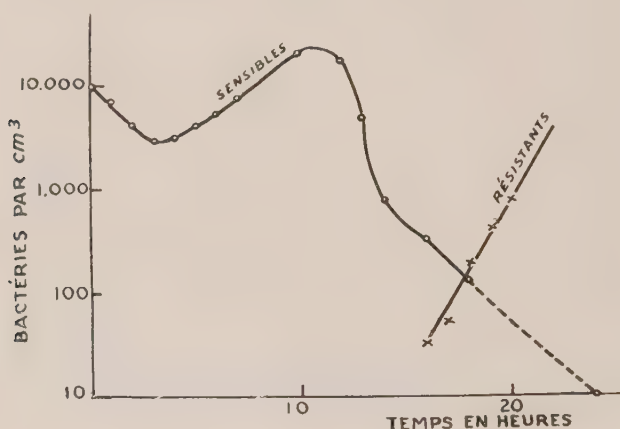
TABLEAU II.

TEMPS en heures	SENSIBLES	RÉSISTANTS
1	100	0
2	10	0
4	10	0
5	50	0
6	80	0
7	260	0
8	730	0
9	7×10^3	0
10	2×10^4	0
11	$2,8 \times 10^4$	0
12	$4,8 \times 10^4$	0
14,30	$2,4 \times 10^6$	0
16,30	4×10^5	0
17,30	$7,8 \times 10^4$	110
18	$2,9 \times 10^4$	240

Au bout de trente-six heures, on trouve 7×10^8 bactéries par centimètre cube dont encore une proportion notable de bactéries sensibles.

Dans les deux expériences l'évolution générale est la même, mais dans la première toutes les bactéries sensibles sont finalement lysées ; dans la seconde, il en persiste un certain nombre. Dans ces conditions expérimentales, l'évolution se fait en quatre stades.

Premier stade : Lyse initiale. — Un certain nombre de bactéries est rapidement lysé, dans les deux premières heures.



Expérience du tableau I. — L'une des courbes montre les divers temps de l'évolution des cultures de bactéries sensibles en présence du phage, l'autre l'apparition et la multiplication des résistants (coordonnées semi-logarithmiques).

souvent dans la première. La lyse porte sur une proportion variable de bactéries, comme le montre la comparaison entre les deux expériences relatées ci-dessus.

Mais deux phénomènes inattendus se produisent : 1° malgré l'énorme excès de phages présent, toutes les bactéries sensibles ne sont pas lysées ; 2° le nombre des bactéries lysées est d'autant plus grand qu'il y en avait davantage au départ. Ainsi, en comparant trois expériences, où seul varie le nombre de bactériesensemencées, on constate qu'au bout de trois heures :

Dans les tubes ayant reçu au total 2×10^4 bactéries . .	$1,9 \times 10^4$ ont été lysées.
Dans les tubes ayant reçu au total 2×10^5 bactéries . .	$1,4 \times 10^5$ —
Dans les tubes ayant reçu au total 2×10^6 bactéries . .	$1,98 \times 10^6$ —

Nous verrons même que si le nombre des bactéries est très petit, aucune n'est lysée au début.

Deuxième stade : Bactériostase des bactéries sensibles survivantes. — Cette bactériostase n'était pas absolue dans les exemples choisis. Elle l'est dans d'autres. Mais dans tous les cas, on constate que le nombre de bactéries sensibles n'augmente presque pas pendant les cinq à huit premières heures. Aucun résistant n'apparaît pendant cette période.

Troisième stade : Multiplication tardive des germes sensibles bactériostasés et deuxième lyse. — La comparaison entre les deux expériences précédentes montre que cette multiplication est plus ou moins importante et plus ou moins prolongée.

La lyse la suit parfois très rapidement. Elle peut commencer avant que la multiplication ne soit terminée. Aussi cette multiplication ne peut être mise en évidence que si on suit l'évolution d'heure en heure.

Quatrième stade : Apparition et multiplication des résistants. — Ils apparaissent pendant ou après la deuxième lyse, et se multiplient plus ou moins vite. Parfois ils paraissent subir à leur tour une bactériostase temporaire. Ils finissent par donner une culture d'abondance égale à celle du témoin.

Finalement les bactéries sensibles peuvent disparaître complètement ou persister en partie.

Influence du nombre de bactéries sur l'évolution des cultures. — Des expériences ont été faites avec diverses quantités de bactéries, en présence de la même quantité de phages (1 cm³ d'un lysat du phage D4/2 de titre $1,2 \times 10^9$ par centimètre cube dans 10 cm³ de culture). Il y avait donc toujours un grand excès de phages. Le tableau III en donne les résultats.

TABLEAU III.

BACTÉRIES ensemencées par cm ³	BACTÉRIES SENSIBLES SURVIVANTES par cm ³		
	après 3 heures	après 7 heures	après 24 heures
100	110	140	0
2×10^3	90		0
2×10^4	6×10^3	8×10^3	0
2×10^5	$1,5 \times 10^3$	++++	0
2×10^6	5×10^7	Lyse partielle.	0

Des numérations de bactéries résistantes ont été faites à chaque prélèvement. Nous n'en donnons pas le résultat, pour ne pas surcharger le tableau. Il suffit de dire que les résistants ont commencé à paraître au bout de trois heures, pour des quantités

de bactéries ensemencées égales ou supérieures à 2×10^4 , et seulement après sept heures pour des quantités inférieures de bactéries ; enfin, au bout de vingt-quatre heures, il y avait dans toutes les cultures un grand nombre de résistants. Nous n'avons pas donné non plus les numérations des bactéries des cultures témoins où la multiplication était normale. Dans tous les tubes ayant reçu du phage, la multiplication subit un retard considérable par rapport au témoin. Mais on voit surtout que pour les plus petites et les plus grandes quantités de bactéries, la bactériolyse initiale fait défaut. Pour les quantités très petites, la bactériostase se produit d'emblée. Elle est ici totale. D'autres fois, avec un nombre de bactéries du même ordre, une certaine multiplication a lieu, mais toujours très inférieure à celle du témoin. Pour des grandes quantités de bactéries (10^6 par centimètre cube), une multiplication est habituellement observée. Nous n'avons pas étudié ce cas en détail et nous ne pouvons affirmer que la bactériostase fasse entièrement défaut. Dans ce cas, d'ailleurs, un certain nombre de bactéries résistantes est ensemencé avec les bactéries sensibles, et les phénomènes sont difficiles à analyser.

Influence du nombre de phages. — Nous donnons ci-après un tableau (tableau IV) où des quantités de bactéries du même ordre (de 10^3 à 10^4) et provenant de la même souche ont été mises en présence de quantités différentes du même phage.

On voit que la lyse initiale n'est observée que si le rapport $\frac{\text{Phage}}{\text{Bact.}}$ est assez grand (ici de l'ordre de 10^3 au moins) et que c'est seulement quand ce rapport prend la valeur énorme de 8.10^5 qu'on obtient la lyse totale et définitive.

On pourrait objecter que dans les cas où l'on a introduit dans le milieu un très petit nombre de phages et de bactéries, les probabilités de rencontre des uns et des autres sont faibles ; mais l'existence de la bactériostase initiale et de la lyse tardive démontre à l'évidence la réalité de l'action du phage sur les bactéries, quelles que soient leurs concentrations dans le milieu. Même dans le cas où il y a très peu de bactéries, la rencontre a lieu, puisqu'on peut stériliser une culture qui ne contient que 20 bactéries par centimètre cube.

Pour ne pas surcharger le tableau nous n'avons indiqué le nombre des résistants qu'au bout de vingt-quatre heures. Aucun résistant n'a pu être décelé dans les huit premières heures pour les expériences 3, 2, 5, 6 ; au contraire, dans les expériences 1, 4, 7 et 8 quelques résistants ont apparu à la cinquième ou sixième heure et se sont multipliés progressivement.

Dans les expériences 4, 7, 8, il est possible que quelques bacté-

TABLEAU IV.

NUMÉRO	ÉTAT INITIAL			BACTÉRIES								
	Bactéries	Phages	Phages Bactéries	Après 1 heure	Après 2 heures	Après 4 heures	Après 5 heures	Après 6 heures	Après 7 heures	Après 8 heures	Après 24 heures	
											Sens	Rés.
1	$1,2 \times 10^4$	3×10^3	0,25	$1,6 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$		$2,4 \times 10^4$	530	630	$2,6 \times 10^3$		
2	$1,4 \times 10^3$	5×10^3	4,3		$3,7 \times 10^3$	$6,7 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$			$6,2 \times 10^7$	10^3
3	$1,6 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$	10	$1,4 \times 10^3$		$1,7 \times 10^4$	2×10^4	$1,2 \times 10^4$	420		$6,5 \times 10^6$	10^4
4	$1,3 \times 10^3$	5×10^5	400	1×10^3	740	$2,6 \times 10^3$	$3,4 \times 10^3$	3×10^3	$1,6 \times 10^6$	420	9×10^6	2×10^3
5	1×10^3	$1,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^3$	< 10	< 10	< 10	40	40				
6	$1,4 \times 10^3$	6×10^6	$4,3 \times 10^3$	< 10	< 10	40	20	40	70	180	6×10^6	10^3
7	1×10^3	7×10^7	7×10^4	< 10		< 10	< 10	60				
8	2×10^4	$1,2 \times 10^9$	6×10^3	< 10		< 10	20	420		210	0	2×10^8
9	$1,6 \times 10^3$	5×10^8	3×10^8	170	30	0	0	0	0		0	0
10	$1,6 \times 10^3$	$1,2 \times 10^9$	8×10^8	0		0	0	0	0		0	0

Tous les résultats sont exprimés en nombre de phages ou de bactéries par centimètre cube de culture.

Tous les résultats sont exprimés en nombre de phages ou de bactéries par centimètre cube de culture.

ries résistantes aient été introduites au moment de l'ensemencement, en particulier dans l'expérience 8, où le nombre des bactéries ensemencées était plus grand.

On voit, par ailleurs, que dans plusieurs cas il restait encore beaucoup de bactéries sensibles au bout de vingt-quatre heures, ce que nous n'avons pas observé avec le phage très concentré. Nous discuterons également ce point plus loin.

Influence de la composition des populations bactériennes soumises à l'action du phage. — Le taux de mutation des bactéries sensibles en bactéries résistantes du phage D4 paraît élevé chez *S. enteritidis* var. Danysz.

Il en résulte que le pourcentage de bactéries résistantes varie suivant l'importance de l'ensemencement ; et pour une même culture suivant les populations bactériennes qui en sont issues, car les bactéries résistantes y sont réparties suivant les lois statistiques.

Dans le cas où l'ensemencement introduit d'emblée des bactéries résistantes dans le milieu, celles-ci ne subissent pas de bactériostase et se multiplient normalement. L'évolution des cultures s'en trouve profondément modifiée.

Un cas particulier, que nous avons observé plusieurs fois, est celui où certaines bactéries de la souche sont lysogènes. Ces bactéries lysogènes étaient généralement en petit nombre et par conséquent les phages étaient également peu nombreux dans la souche. Les bactéries lysogènes et les bactéries sensibles coexistaient donc avec les phages dans la souche. Dans ces cas, ces bactéries lysogènes se multiplient dès les premières heures et toute stérilisation par le phage qu'elles portent est impossible.

Influence de la race du phage. — En comparant à l'action du phage D4/2 celle d'un autre phage T5/0 sur la même souche 2, nous avons constaté que, avec T5/0, pour les mêmes nombres de bactéries et de phages, la bactériolyse initiale est plus intense, *la bactériostase se prolonge beaucoup plus longtemps qu'avec D4/2*, de sorte que, si on se borne à examiner l'opacité de la culture pendant les vingt-quatre ou quarante-huit premières heures, on peut croire souvent que la stérilisation est complète. On a la surprise de voir se développer très tardivement une culture résistante. Avec D4/2, quel que soit le nombre des bactéries examinées, l'opacité de la culture est très forte au bout de vingt-quatre heures. Inversement, certains phages paraissent n'exercer aucune action sur les cultures de la souche 2 bien qu'ils donnent des plages sur cette souche. Le phage D 5 paraît même accélérer le développement des cultures, qui deviennent opaques avant les témoins sans phages.

DEUXIÈME TYPE D'ÉVOLUTION. STÉRILISATION DE LA CULTURE.

Quand la stérilisation se produit, elle est extrêmement rapide. La bactériolyse initiale est totale, aucune bactérie ne survit. Souvent dès le premier prélèvement, au bout d'une heure, toutes les bactéries sont tuées. D'autres fois, il reste à ce moment quelques survivantes et parfois encore quelques-unes au bout de deux heures. Jamais nous n'avons retrouvé de bactéries vivantes après ce délai, dans les cas où il y avait stérilisation. La stérilisation est donc souvent presque d'emblée totale. Par contre, jamais on n'observait de stérilisation si la bactériolyse des premières heures laissait des survivants, si peu nombreux qu'ils fussent. Dans ce cas, la phase de multiplication secondaire se produisait toujours. Un certain nombre de conditions doivent être réalisées pour obtenir la stérilisation ; elles concernent la race et le mode de préparation du phage, sa concentration dans le milieu et aussi le nombre de bactériesensemencées. La souche bactérienne a certainement aussi son importance, mais nous n'avons pas encore étudié ce facteur, tous les essais ayant été faits avec la souche 2.

Pour étudier les conditions de la stérilisation, il était inutile de répéter les numérations de bactéries. Nous avons simplement observé les cultures et nous avons vérifié que celles qui ne s'opacifiaient pas ne contenaient plus de bactéries vivantes.

1° Influence de la race et du mode de préparation du phage.

— Au point de vue du mode de préparation, nous n'envisagerons ici que le choix de la souche qui a servi à préparer le lysat.

Parmi les préparations de phages utilisées dans ce travail, seules D4/2, T5/0 et T5/2 se sont montrées capables de stériliser une culture de la souche 2. D4/1, D5/1, D5/2, T5/1 n'avaient pas de pouvoir stérilisant sur cette souche.

2° Influence du nombre de bactéries. — Un phage ne peut pas, dans des conditions expérimentales données, stériliser plus d'un certain nombre de bactéries. Ce nombre diffère suivant la race du phage.

D 4/2 ne pouvait pas, dans les conditions réalisées, stériliser plus de 1.000 bactéries par centimètre cube : T 5/0 a pu stériliser jusqu'à 2×10^5 bactéries par centimètre cube ; l'action de T 5/2 était analogue à celle de T 5/0, mais généralement moins puissante.

3° Influence de la concentration du phage. — Nous avons déjà vu, sur l'exemple de D4/2, que la lyse partielle initiale d'un nombre donné de bactéries exige une certaine concentration des phages, et qu'à partir d'une concentration beaucoup plus élevée, on obtient la lyse totale.

Avec le phage T5/0, dont la puissance de stérilisation est grande, on peut constater que, si l'on augmente le nombre de bactéries, la concentration en phage nécessaire à la stérilisation est d'autant plus élevée que le nombre des bactéries est plus grand.

Les expériences montrent en même temps que, en l'absence de stérilisation, le développement de la culture peut être retardé et que le retard est d'autant plus grand que le nombre de bactéries est plus petit. Il l'est aussi d'autant plus que la concentration en phage est plus forte. Par exemple, 1 cm³ du phage T5/0 dans 10 cm³ stérilise 200 et 2×10^3 bactéries par centimètre cube. Il retarde une culture de 2×10^4 et 2×10^5 bactéries par centimètre cube. 0,5 cm³ de ce phage stérilise seulement 200 bactéries par centimètre cube, mais retarde jusqu'à 2×10^3 bactéries par centimètre cube. A la dose de 1/10 de centimètre cube, il stérilise encore 200 bactéries par centimètre cube, mais ne retarde pas plus de 2×10^4 bactéries par centimètre cube. A la dose de 1/100 de centimètre cube, il ne stérilise même pas une culture de 200 bactéries par centimètre cube, mais en retarde encore le développement.

Mais les résultats ne sont pas constants dans des conditions expérimentales identiques : 1° on a quelquefois obtenu une stérilisation avec 0,5 cm³ de phage, alors qu'elle manquait avec 1 cm³ du même lysat dans une culture identique ; 2° le phage T5 a parfois, dans une même expérience, stérilisé 2×10^5 bactéries par centimètre cube et non 2×10^4 bactéries, par exemple ; 3° si on ensemence en même temps 2×10^3 bactéries par centimètre cube et 1 cm³ de la même préparation de T5, dans 20 tubes identiques, on constate que les cultures sont stérilisées dans un grand nombre de tubes, mais qu'elles se développent dans quelques-uns.

Essais de stérilisation par des mélanges de phages. — En introduisant simultanément dans une culture des phages appartenant à deux ou trois races différentes, on obtient, au point de vue de la stérilisation, des résultats bons ou mauvais suivant les cas.

Ainsi le mélange de T5/0 et de D5A/1 stérilise mieux que chacun des phages séparément. Par contre, certains phages comme D5 sont de mauvais phages au point de vue de la stérilisation. Non seulement ce phage ne donne jamais de stérilisation, mais, ajouté à T5 ou à D4, il empêche la stérilisation par ceux-ci. On peut même observer, à la suite de l'addition de certains mélanges de phages, tels D4/1 +, D5/1, à un ensemencement de 20 bactéries par centimètre cube, le développement d'une culture visible au bout de quelques heures, alors que le témoin sans phage est encore clair.

DISCUSSION.

Dans ces résultats, plusieurs faits importants sont à souligner :

- 1° L'impossibilité fréquente de stériliser les cultures même avec un grand excès de phages ;

- 2° La survie d'un certain nombre de bactéries sensibles dans des milieux où existe une forte concentration de phages ;

- 3° La bactériostase de ces bactéries sensibles survivantes ;

- 4° L'apparition des résistants ;

- 5° La persistance possible de bactéries sensibles à la fin de l'évolution.

1° **L'obstacle à la stérilisation des cultures** n'est pas constitué, dans beaucoup de cas, par la présence de bactéries résistantes. Les preuves en sont nombreuses.

a) Après la lyse partielle initiale, les bactéries survivantes sont sensibles.

b) Si cette lyse fait défaut, c'est dans le cas où l'on a ensemencé peu de germes, c'est-à-dire où les chances de présence au départ de bactéries résistantes sont le plus faibles possible.

c) Après un étalement de 2×10^6 bactéries de la souche 2 avec un lysat concentré de T5/0, par exemple, aucune colonie n'apparaît, et cependant ce phage ne stérilise même pas un total de 2×10^4 bactéries en milieu liquide.

Inversement, après un étalement de 2×10^3 bactéries de la même souche avec D4/2 concentré, quelques colonies « résistantes » apparaissent, alors que ce phage peut stériliser le même nombre de bactéries en milieu liquide.

Bien plus, un mélange des phages D4/1, D4/2 et T5/0 stérilise sur gélose un étalement de 10^7 bactéries de la souche 2 (chacun des phages séparément n'empêchant pas l'apparition de colonies résistantes dans les mêmes conditions) ; et cependant le même mélange en milieu liquide ne stérilise souvent pas 2×10^5 bactéries.

d) Avec un certain phage on stérilise parfois 2×10^5 bactéries en milieu liquide, alors que dans la même expérience on n'en stérilise pas 2×10^4 avec la même quantité du même phage.

e) Pour obtenir une stérilisation, il ne suffit pas que le phage soit notablement en excès, il faut que sa concentration par rapport au nombre de bactéries soit énorme.

2° **La survie de bactéries sensibles en présence de phages.** — Trois hypothèses peuvent être faites à ce sujet :

a) On peut supposer que les lysats contiennent des substances antiphages ;

b) Que l'action des phages sur les bactéries ne peut se produire qu'avec l'association d'un facteur adjuvant venu des bactéries.

ries ou du lysat et qui se trouverait en quantité insuffisante dans les systèmes étudiés ;

c) Enfin, les bactéries survivantes pourraient appartenir à une variété différente de celle des bactéries qui sont lysées et opposer une certaine résistance à l'action du phage.

Ces hypothèses ne s'excluent pas mutuellement.

a) *Les lysats contiennent-ils des substances antiphages ?* — Cette hypothèse peut être éliminée pour deux raisons : il est impossible que le pouvoir antiphage de la même quantité de lysat soit d'autant plus faible qu'il y a moins de bactéries à lyser. Par ailleurs, le nombre des bactéries sensibles survivantes n'est pas plus grand avec des lysats purs qu'avec des lysats dilués cent fois. Ceux-ci devraient apporter au système cent fois moins de ces hypothétiques substances antiphages. Au contraire, le nombre des survivants, quand on emploie des lysats dilués, loin d'être diminué, est souvent plus grand.

b) *Les phages n'agissent-ils qu'en association avec un facteur adjuvant venu des bactéries ?* — Cette hypothèse a plus de consistance que la précédente. En effet, nous avons vu qu'une même préparation de phages lyse d'autant plus de bactéries qu'on en a introduit davantage dans la culture et, par ailleurs, on sait que, d'une façon générale, les phages se multiplient mieux quand ils sont introduits un certain temps après les germes, quand le métabolisme de ceux-ci est en pleine activité. De plus, nous avons vu précédemment que seuls les lysats concentrés peuvent stériliser des cultures, et il se pourrait que cette propriété soit due à leur forte concentration en substances adjuvantes, plutôt qu'à leur titre élevé en phages.

Ce facteur pourrait provenir soit du métabolisme normal des bactéries, soit de leur métabolisme modifié par l'induction spécifique du phage. Dans le premier cas on devrait le trouver dans les milieux de culture où les bactéries se sont multipliées seules, dans le second dans des lysats dont les phages ont été inactivés ou éliminés.

En ajoutant au système phages-bactéries diverses quantités de cultures de la souche 2 âgées de six heures à trente heures, centrifugées et filtrées à pH 7,8, nous n'avons jamais obtenu de lyse totale des bactéries sensibles.

Quelques essais ont été faits avec des lysats dont les phages étaient inactivés par du sérum spécifique. Ils ont été négatifs.

Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence ni dans les milieux de culture, ni dans les lysats, de facteurs adjuvants qui permettraient la stérilisation des cultures par le phage. Mais les essais sont insuffisants pour permettre une conclusion définitive, car les faits précédents et ceux que nous allons voir constituent des arguments sérieux en faveur de leur existence.

c) *Les bactéries survivantes opposent-elles une certaine résistance à l'action du phage ?* — Nous avons, dans tout ce qui précède, considéré comme bactéries « sensibles » toutes celles qui ne donnaient pas de colonies sur gélose en présence de bactériophage concentré.

Cette notion doit-elle subir des retouches ? On peut se demander si les bactéries de nos souches n'appartiennent pas en totalité ou en partie au type décrit par R. Wahl et L. Blum-Emerique [9] sous le nom de « bactéries semi-résistantes ». Sur des souches contenant beaucoup de bactéries semi-résistantes à un phage, celui-ci donne des plages plus petites, moins nombreuses, parfois simultanément des plages de deux types différents ; la fixation et la multiplication du phage sont plus difficiles sur ces souches.

Ces réactions sont bien celles de nos souches vis-à-vis des phages utilisés, en particulier de la souche 2 pour D4. De plus, en repiquant plusieurs des colonies secondaires développées après la lyse par D4/2 d'un étalement de la souche 2 sur gélose, on s'aperçoit que la subculture présente des plages ou des colonies irrégulières, preuve que le phage est actif au moins sur certaines de ces bactéries. Enfin, si on isole à partir de ces subcultures une souche débarrassée de phage, et qu'on titre comparativement le phage D4/2 sur cette nouvelle souche et sur la souche 2, on constate que ce phage donne environ 500 fois moins de plages sur la première. Il est possible que la souche 2 donne beaucoup moins de mutants semi-résistants à T5/0 qu'à D4/2, ce qui expliquerait les différences d'action des deux phages.

Mais il faut également rendre compte des deux faits mentionnés plus haut : le phage lyse d'autant plus de bactéries que la culture en contient davantage ; seuls les lysats concentrés peuvent stériliser des cultures. Ces faits sont en accord avec la constatation que nous avons faite que la bactériolyse partielle initiale manque complètement, quand le nombre de bactéries ensemencées est très petit ou quand le phage est très dilué.

En fin de compte, un facteur adjuvant paraît donc bien nécessaire pour lyser les bactéries sensibles ou semi-résistantes ; et ces dernières semblent en exiger une quantité plus élevée que les sensibles.

R. Wahl et J. Josse-Goichot [7, 8] ont décrit un *facteur bactériostatique* présent dans certains lysats et capable de produire, en association avec le phage, la lyse de certaines bactéries sur lesquelles le phage seul est sans action. Il serait intéressant de rechercher ce *facteur bactériostatique* dans nos lysats. Ces auteurs ont montré que la richesse en *facteur bactériostatique* d'un lysat dépend de son mode de préparation.

Ces faits pourraient peut-être expliquer les contradictions apparentes de nos expériences de stérilisation.

3° La bactériostase des bactéries sensibles non lysées. — On peut envisager, pour l'expliquer, soit l'intervention de facteurs bactériostatiques du lysat, soit une bactériostase par les phages eux-mêmes.

La première hypothèse était peu vraisemblable, car la bactériostase est aussi intense, sinon plus, avec des lysats dilués, qu'avec des lysats purs. Elle a été éliminée à la suite des expériences suivantes :

Nous avons ajouté à des lysats du sérum anti-phage spécifique à raison de IV gouttes pour 10 cm³ et après un séjour de deux heures à l'étuve nous avons constaté que tous les bactériophages étaient inactivés. Nous avons alors ajouté des quantités variables de ces lysats inactivés à des cultures ensemencées avec des quantités variables de germes. Nous avons suivi l'évolution de ces cultures, parallèlement à des témoins, par numération des colonies sur plaques de gélose. Nous n'avons jamais constaté de bactériostase et les cultures ont poussé normalement, sauf que, au bout de vingt-quatre heures, on constatait que les germes qui avaient poussé étaient agglutinés. Enfin, nous n'avons pas constaté d'augmentation du nombre des résistants par rapport à celui des témoins sous l'influence des lysats inactivés.

Nous voyons que le lysat ne semble pas être responsable de la bactériostase. Celle-ci paraît donc causée par les phages eux-mêmes. On sait que le premier effet de la fixation des phages sur des bactéries sensibles est l'arrêt de leur multiplication. La bactériostase par les phages est donc le premier temps normal de la bactériophagie, les temps suivants étant la multiplication des phages dans les bactéries et la lyse.

On peut se demander si, dans le cas présent, les deux autres temps ne pourraient se produire qu'avec l'aide du facteur adjuvant, dont nous avons supposé l'existence au paragraphe précédent. Ainsi se trouverait expliquée également l'existence d'un certain balancement entre la bactériostase et la lyse.

4° L'apparition tardive des bactéries résistantes s'explique facilement par des mutations apparues au cours de la phase de multiplication, elle-même retardée.

5° La persistance, d'ailleurs inconstante, de bactéries sensibles à la fin de l'évolution, a probablement une cause analogue à celle de la survie de bactéries sensibles après la première lyse, c'est-à-dire le manque de facteurs adjuvants de l'action du phage.

CONCLUSIONS.

L'évolution des cultures en présence de phages peut se faire suivant deux types différents :

Dans le premier type il n'y a jamais de stérilisation. — On observe généralement *quatre stades* (pour une quantité moyenne de bactéries avec un lysat concentré) : lyse partielle initiale ; bactériostase des germes sensibles survivants ; multiplication tardive de ceux-ci et seconde lyse partielle ; apparition et multiplication des résistants.

Quand le nombre de bactéries est très grand ou très petit, le premier stade manque. Il en est de même quand le lysat est assez dilué.

Dans le deuxième type, il y a toujours stérilisation. Celle-ci est très rapide et totale d'emblée.

Quelques particularités distinguent l'une de l'autre l'action des phages D 4/2 et T 5/0.

Avec D 4/2 on observe presque toujours le premier type, dont les quatre stades sont parcourus assez rapidement (en vingt-quatre heures). Le deuxième type est exceptionnel avec ce phage.

Avec T 5/0 l'évolution du premier type est sensiblement plus lente. Le deuxième type est plus fréquent qu'avec D 4/2.

Quatre faits remarquables sont à souligner *dans l'évolution du premier type*.

a) Le premier fait est la *survie des bactéries sensibles en présence de phages*. Elle n'est pas due à des substances anti-phages. L'hypothèse que nous retenons est que les bactéries bactériostasées sont du type « semi-résistant » décrit par R. Wahl et L. Blum-Emerique, et qu'un facteur adjuvant du phage, nécessaire à son action sur ces bactéries, se trouve en quantité insuffisante dans le système.

b) Le second fait est la *bactériostase des bactéries sensibles* (ou semi-résistantes) survivantes. Elle paraît due aux phages eux-mêmes et non à d'autres facteurs du lysat.

c) Le troisième fait est l'*apparition des résistants* à la fin de l'évolution. Elle paraît consécutive à la multiplication tardive des bactéries sensibles survivantes.

d) Enfin la *persistance possible de bactéries sensibles* à la fin de l'évolution aurait la même cause que la survie de bactéries sensibles après la première lyse.

La connaissance des conditions de stérilisation des cultures par le phage peut avoir un intérêt pratique, en particulier pour des essais thérapeutiques. Ces conditions sont les suivantes :

1° Une race de phage spécialement favorable. Il y a de bons et de mauvais phages, cette distinction n'ayant d'ailleurs de sens que pour une souche donnée.

2° Un nombre de bactéries pas trop grand.

3° Une concentration de phages très élevée et d'autant plus qu'il y a davantage de bactéries à détruire.

4° Les mélanges de phages donnent, suivant les cas, des résultats égaux, meilleurs ou plus mauvais que les phages purs.

L'obstacle à la stérilisation est, en l'absence de bactéries résistantes, la survie de bactéries sensibles ou semi-résistantes. On peut se demander si, pour détruire celles-ci, l'action associée du phage et de certains facteurs adjuvants contenus dans les lysats n'est pas nécessaire. Leur survie serait donc due à ce que ces facteurs sont souvent en quantité insuffisante dans les systèmes envisagés.

La recherche de ces facteurs fera l'objet d'une prochaine publication.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ASHESHOV (I. N.), WILSON (J.) et TOPLEY (W. W. C.). *Lancet* 1937, **4**, 319.
- [2] DUBOS (R.-J.), STRAUS (J. H.) et PRICE (C.). *J. exp. Med.*, 1943, **78**, 161.
- [3] FISK (R. T.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1948, **38**, 659.
- [4] KRUEGER (A. D.) et SCRIBNER (E. J.). *J. Am. med. Assoc.*, 1941, **116**, 2166 et 2269.
- [5] MORTON (H. E.) et ENGLE (F. B.). *J. Bact.*, 1944, **47**, 475.
- [6] MORTON (H. E.) et ENGLE (F. B.). *J. Am. med. Assoc.*, 1945, **127**, 584.
- [7] WAHL (R.) et JOSSE-GOICHOT (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 1225.
- [8] WAHL (R.) et JOSSE-GOICHOT (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**.
- [9] WAHL (R.) et BLUM-EMERIQUE (L.). *Ces Annales* (sous presse).
- [10] WAHL (R.) et TERRADE (A.). *Ces Annales*, 1950 (sous presse).
- [11] WARD (W.). *J. Bact.*, 1946, **59**, 619.

ETUDES SUR LE COLLAGÈNE

V. — COLLAGÉNASES BACTÉRIENNES ET POUVOIR ANTI-COLLAGÉNASIQUE DES SÉRUMS HUMAINS NORMAUX

par ALBERT DELAUNAY, MAYLIS GUILLAUMIE, ALI BOUJNAH
et GUY BASSET (*).

(Institut Pasteur.)

I. — Poursuivant notre inventaire des germes producteurs d'une collagénase, nous avons expérimenté avec plusieurs souches de *Cl. bifementans*. Tissier et Martelly (1902), Jennisson (1945), Evans (1947) ont déjà signalé que cet anaérobie attaque lentement les substances collagènes. Les premiers auteurs n'ont pas mentionné leurs conditions expérimentales ; Jennisson a décelé l'activité collagénasique des *filtrats bifementans* en les faisant agir sur du tendon de bœuf ; Evans a utilisé de la poudre de peau comme source de collagène. Dans nos recherches, nous avons employé du collagène A préparé selon la méthode de Nageotte et Guyon ; actuellement, ce collagène non dégradé est considéré comme l'indicateur le plus sensible des collagénases.

Nous avons examiné 9 cultures de *Cl. bifementans* : 5 ont été préparées avec la souche historique de Tissier et Martelly, 2 avec la souche Gué et 2 avec la souche H. Les 3 souches ont étéensemencées dans différents bouillons Vi glucosés à 2 p. 1.000. Les cultures, obtenues à 32°, ont été centrifugées énergiquement dix-huit heures après l'ensemencement des bouillons. Tous les centrifugats, sans exception, se sont montrés hémolytiques : dans tous, une hémolysine oxydable était présente (Guillaumie, Fagonde et Kréguer). Pour déterminer s'il existait en outre une collagénase dans ces liquides, nous avons procédé de la façon suivante :

Dans 4 tubes, nous avons mis des doses décroissantes du centrifugat à éprouver : 0,8-0,6-0,4-0,2 cm³. Nous avons complété le volume à 1 cm³ avec de l'eau physiologique additionnée de phénol et de phosphates (pH 6,5). Après introduction d'une pastille de collagène dans chaque mélange, les tubes ont été mis à 37° et observés toutes les vingt-quatre heures. Au cours de ces

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} juin 1950.

recherches avec *Cl. bifermentans*, nous avons mis en œuvre des pastilles de collagène extrêmement légères, pesant seulement de 0,080 à 0,100 mg. Rappelons que de nombreux filtrats *perfringens* et *histolytique* sont capables, à la dose de 0,05 cm³, de lyser en quelques heures le collagène A utilisé en présence de tampon phéniqué.

RÉSULTATS.

1° EXPÉRIENCES AVEC LA SOUCHE DE *Cl. bifermentans* DE TISSIER ET MARTELLY. — Un centrifugat provenant d'une culture faite avec cette souche a pu, à la dose de 0,4 cm³, lyser totalement en trois jours le collagène employé. Les 4 autres cultures centrifugées n'ont pas manifesté en quatre jours le moindre effet collagénasique, même à la dose de 0,8 cm³.

2° EXPÉRIENCES AVEC LES SOUCHES GUÉ ET H DE *Cl. bifermentans*. — Les 4 cultures que nous avons préparées avec ces deux souches ont été capables, après centrifugation et à la dose de 0,6 cm³, de lyser le collagène en trois jours.

EN RÉSUMÉ, les trois souches de *Cl. bifermentans* étudiées élaborent une faible quantité de collagénase dans le bouillon V_f glucosé.

II. — L'un de nous a recherché, avec un soin particulier, l'action de la chaleur sur les toxines *perfringens* A, B, C, D, E, F respectivement préparées avec les *Cl. perfringens* correspondants [4].

Toxine *perfringens* A.

Cl. perfringens A fait apparaître, à 32°, dans le bouillon V_f glucosé, une toxine complexe contenant de nombreux antigènes, notamment : la lécithinase dermonécrosante α , l'hémolysine oxydable ϵ , la collagénase K. Lorsqu'on porte une telle toxine à différentes températures, on observe les faits suivants :

1° La toxine *perfringens* A, fraîchement centrifugée, perd ses propriétés en cinq minutes à 70° : après ce bref chauffage, elle n'est plus toxique *in vivo* ni hémolytique *in vitro*.

2° Une toxine qui a perdu son activité au cours d'un chauffage de cinq minutes à 70° redevient généralement nocive si on la maintient ensuite pendant cinq minutes à 100° ; elle possède, après ce deuxième chauffage, les propriétés qui caractérisent les antigènes α et θ : elle tue les animaux injectés par voie veineuse ; en injection intradermique, elle provoque de fortes lésions nécrotiques ; *in vitro*, elle décompose la lécithine et lyse les globules rouges de diverses espèces animales.

3° La toxine *perfringens* A préparée depuis un certain temps ou

filtrée sur bougie contient l'antigène α après un seul chauffage de cinq minutes à 70°.

Toxines perfringens B, C, F.

Les toxines *perfringens* B, C, F fraîchement centrifugées renferment encore, après cinq minutes de chauffage à 100°, des quantités notables d'antigène β . Par contre, après cinq minutes à 70°, elles ne sont plus nocives. Un chauffage de cinq minutes à 100° fait apparaître en quantité appréciable l'antigène β dans les toxines *perfringens* B, C, F préalablement inactivées à 70°.

Toxine perfringens D.

La toxine *perfringens* D traitée par la trypsine contient, après cinq minutes de chauffage à 100°, l'antigène léthal et dermonécrosant ϵ ; cet antigène n'est pas décelable dans la toxine chauffée pendant cinq minutes à 70°. Lorsque l'antigène ϵ a été inactivé à 70°, on ne parvient pas à restaurer ses propriétés en le chauffant ensuite pendant cinq minutes à 100°.

Toxine perfringens E.

L'antigène ι (*iota*) de la toxine *perfringens* E perd sa nocivité en cinq minutes à 70° ou 100°.

L'ensemble de ces résultats montre que les toxines *perfringens* A, B, C, D, E, F fraîchement centrifugées ne sont plus nocives après cinq minutes de chauffage à 70°. Les toxines A, B, C, D, F sont nocives après cinq minutes à 100°. Les antigènes α et β des toxines inactivées à 70° récupèrent une partie de leur activité au cours d'un chauffage ultérieur à 100°.

La collagénase K peut-elle, comme la lécithinase α et comme les antigènes nécrosants β et ϵ , manifester encore ses propriétés après cinq minutes de chauffage à 100° ? ou bien, est-elle inactivée à 100° tout aussi facilement qu'à 70° ? Pour nous en rendre compte, nous avons titré 7 préparations de toxine *perfringens* A, avant de les chauffer et après les avoir laissées pendant cinq minutes dans des bains-marie à 70° ou à 100°.

L'activité des toxines a été recherchée selon nos procédés habituels : la dose minima collagénasique en présence de collagène A et de tampon phéniqué [2] ; la dose minima lécithinasique en présence de sérum humain, de Ca et d'eau physiologique additionnée de 0,3 p. 100 de phénol [3] ; la dose minima hémolytique en présence d'hématies lavées de mouton mises en suspension dans de l'eau physiologique.

Au cours de ces titrages, nous avons utilisé des pastilles de collagène de 0,260 à 0,350 mg. Dans le tableau I nous indiquons la plus petite dose de toxine filtrée qui lyse totalement une de ces pastilles en quarante-huit heures.

La dose minima lécithinasique des 7 toxines que nous avons titrées avant tout chauffage a varié entre 0,007 et 0,02 cm³. Après cinq minutes de séjour dans un bain-marie à 70°, les toxines n'ont pas attaqué le collagène même lorsque nous les avons employées à la dose de 0,8 cm³. Cette observation a été faite en utilisant soit des toxines fraîchement centrifugées, soit des toxines préparées depuis un certain temps, soit des toxines filtrées.

Après cinq minutes de chauffage à 100°, nos différentes préparations de toxine *perfringens* A sont dépourvues de toute activité collagénasique à la dose de 0,8 cm³. Leur effet lécithinasique est cependant encore des plus manifeste, ainsi qu'on peut le voir en examinant la dernière colonne du tableau I. Quant à la dose minima hémolytique de ces toxines chauffées à 100° pendant cinq minutes, elle est égale à 0,2 ou 0,4 cm³.

Des ces résultats on peut conclure que la collagénase K de la toxine *perfringens* A est plus sensible à l'action de la chaleur que la lécithinase α . Elle est plus labile que les antigènes β et ϵ respectivement présents dans les toxines *perfringens* B et D.

TABLEAU I. — Action de la chaleur sur différentes préparations de toxine *perfringens* A filtrée sur bougie L₂.

NUMÉRO ET DATE de la préparation de la toxine étudiée	POIDS des pastilles de collagène (en mg.)	ACTIVITÉ collagénasique		ACTIVITÉ lécithinasique	
		Avant le chauffage Dose minima collagénasique (en cm ³)	Après cinq minutes de chauffage à 70° ou à 100°	Avant le chauffage Dose minima lécithinasique (en cm ³)	Après cinq minutes à 100° Dose minima lécithinasique (en cm ³)
II. Du 13 septembre 1949 . .	0,260	0,02	Nulle.	0,01	0,03
I. Du 13 décembre 1949 . .	0,300	0,007	Nulle.	0,007	0,01
I. Du 21 mars 1950	0,350	0,04	Nulle.	0,01	0,03
II. Du 21 mars 1950	0,350	0,02	Nulle.	0,01	0,03
III. Du 21 mars 1950	0,350	0,02	Nulle.	0,015	0,04

III. — Les toxines produites par *Cl. perfringens* A et *Cl. histolyticum* maintenues à la glacière (+ 4°), conservent pendant des

semaines leur pouvoir toxique général et leur pouvoir dermonécrosant. En revanche, on sait déjà qu'elles perdent assez rapidement ces propriétés lorsqu'elles sont gardées à l'étuve à 39°.

Il nous a paru intéressant d'étudier *comparativement* l'action de cette température maintenue pendant quinze jours sur :

Les activités lécithinasique et collagénasique de la toxine *perfringens* A ;

L'activité collagénasique de la toxine *histolytique* ;

Et sur le pouvoir dermonécrosant de ces deux poisons.

Dans ce but, nous avons placé à 39° divers échantillons de toxines *perfringens* et *histolytique* et, tous les deux jours, nous avons déterminé, d'une part, leur activité enzymatique *in vitro* et, d'autre part, l'importance de leur action nécrosante ; celle-ci était évaluée d'après l'étendue de la lésion produite par l'injection de 0,5 cm³ de toxine non diluée dans le derme de cobayes (2 injections par animal). Nous avons mis en œuvre, pour connaître la teneur des milieux en lécithinase et en collagénase, nos méthodes de titrage habituelles.

En opérant dans ces conditions, nous avons obtenu les résultats suivants :

1° Le chauffage à 39° a diminué, dans tous les cas, la richesse en enzymes des toxines *perfringens* et *histolytique* et pareillement leur pouvoir dermonécrotique. Mais cette action s'est accompagnée de quelques particularités de détail.

2° Parfois, le pouvoir dermonécrotique a disparu avant la destruction complète du pouvoir collagénasique. Ce fait, qui a déjà été signalé par Slavka Mrchevitch et Marcelle Delaunay [4], nous a paru surtout fréquent avec la toxine *histolytique*. Néanmoins, plus souvent, nous avons observé le phénomène contraire. Les toxines *perfringens* A et *histolytique* ayant conservé une partie de leur action nécrotique alors qu'elles ne renfermaient plus trace de collagénases.

Pareille constatation vient indiquer à son tour que l'action nécrosante des toxines anaérobies n'est pas due réellement à leur teneur en collagénases. (A l'heure actuelle, on estime, en général, que le pouvoir dermonécrosant de la toxine *histolytique* dépend d'un antigène léthal non lécithinasique et que celui de la toxine *perfringens* est lié à la lécithinase α .)

3° Le séjour à l'étuve diminue régulièrement l'activité lécithinasique de la toxine *perfringens* A. Par exemple, la dose minima lécithinasique d'une de nos toxines maintenue treize jours à 39° n'était plus (en présence de Ca et de sérum humain) que de 0,05 cm³, alors que, pour ce poison gardé pendant le même laps de temps à la glacière, la dose minima lécithinasique était encore de 0,015 cm³.

Autre exemple. — Une deuxième toxine *perfringens* est

conservée comparativement à 39° et à 4°, pendant quatorze jours. Au bout de ce temps, la dose minima lécithinasique de l'échantillon maintenu à 39° est seulement égale à 0,09 cm³ ; par contre, celle de l'échantillon gardé à 4° est de 0,015 cm³ en présence de Ca et de sérum humain.

4° Quinze jours d'étuve à 39° suffisent, dans presque tous les cas, pour détruire complètement le pouvoir collagénasique des toxines *perfringens* et *histolytique*. En revanche, après quinze jours d'étuve, on trouve encore dans la toxine *perfringens* une forte activité lécithinasique.

IV. Des travaux récents (1) ont permis de découvrir dans des sérums normaux (humains ou animaux) des principes capables de supprimer ou, du moins, d'atténuer l'action des hyaluronidases (surtout de l'hyaluronidase testiculaire).

Ces antihyaluronidases dont la présence ne peut être expliquée par une immunisation préalable, sont habituellement considérées comme de simples inhibiteurs, de nature fermentaire ou non.

De tels inhibiteurs peuvent-ils être aussi mis en évidence dans le cas des collagénases ? Nous avons essayé de répondre à cette question par les expériences suivantes.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE.

Nous nous sommes servis :

1° Des *collagénases* présentes dans les bouillons toxiques obtenus après culture de *Cl. perfringens* ou de *Cl. histolyticum*.

Avant tout examen, la dose minima collagénasique de chacune de nos préparations avait été déterminée par notre méthode habituelle.

2° De *sérums humains*, prélevés chez des sujets sains ou malades et recueillis sans antiseptique ; dans quelques cas assez rares, pour assurer leur stérilité, ils étaient filtrés. Plus de 150 sérums ont été étudiés.

Ils ont été utilisés à l'état frais et après chauffage au bain-marie à 56°, l'action de la chaleur ayant été prolongée plus ou moins longtemps : quinze minutes, trente minutes, une heure.

3° A des quantités variables (1 cm³, 0,5 cm³, 0,2 ou 0,1 cm³) de chaque sérum, frais ou chauffé, nous avons ajouté des quantités de toxine *perfringens* ou *histolytique* qui renfermaient de 2 à 5 doses minima collagénasiques.

Les mélanges sérums + toxines, ajustés à pH 6,5 par un tampon phéniqué, ont été soigneusement agités puis, dans chaque préparation, nous avons déposé une pastille de collagène purifié.

(1) On les trouvera, signalés et analysés, dans la Revue Générale suivante : Albert DELAUNAY et Guy VOISIN : *Les hyaluronidases et leurs propriétés biologiques*, La Presse Médicale, 1950, n° 2, 20.

L'ensemble a été mis dans des étuves à 37-39°. Pendant les jours suivants (durée maximum de l'examen : quatre jours), nous avons surveillé la rapidité avec laquelle la pastille de collagène était détruite.

Les tubes qui nous servaient de témoins (sans sérums) renfermaient seulement, outre une pastille de collagène, des doses décroissantes de la toxine spécialement étudiée dans le titrage en cours, tamponnée à pH 6,5.

RÉSULTATS (voir tableaux II et III).

A. — Sérums frais.

1° Des sérums humains normaux sont capables, dans les trois quarts des cas environ, de supprimer totalement ou, du moins,

TABLEAU II. — Pouvoir anti-collagénasique de différents sérums humains normaux Titrage en présence de 2,5 doses minima collagénasiques de toxine *perfringens* A.

NUMÉRO du sérum	DOSE de sérum (cm ³)	IMPORTANCE DE LA DESTRUCTION DU COLLAGÈNE (++++, lyse complète) au bout de		
		24 heures	48 heures	3 jours
Sérums frais :				
AB ₁	1	—	—	—
	0,5	—	—	—
	0,2	—	+++	
	0,1	++++		
AB ₂	1	—	—	—
	0,5	—	—	++
	0,2	±	++++	
Sérums filtrés :				
AB ₁	1	—	—	—
	0,5	±	++	++
AB ₂	1	±	+	+
	0,5	++	+++	+++
Sérums filtrés puis chauffés pendant 1 heure à 56° :				
AB ₁	1	—	+	+
	0,5	—	++	+++
AB ₂	1	+	++	+++
	0,5	+++	+++	+++
9.	1	—	++	++++
	0,5	+	++	++++

TABLEAU III. — Action de deux sérums humains, frais, sur deux doses minima collagénasiques de toxine *histolytique*.

NUMÉRO du sérum	DOSE de sérum (cm ³)	IMPORTANCE DE LA DESTRUCTION DU COLLAGÈNE (++++ : lyse complète) au bout de		
		24 heures	48 heures	3 jours
AB ₁	1	+	+++	++++
	0,5	+	++	+++
	0,2	++++		
AB ₂	1	—	++++	
	0,5	+	+++	
	0,2	+++	++++	

d'atténuer le pouvoir collagénasique de la toxine *perfringens*. Mais cet effet ne peut être obtenu qu'en présence de quantités considérables de sérum (1 cm³, 0,5 cm³) et de doses relativement faibles de collagénase (maximum : 5 doses minima collagénasiques). L'effet devient pratiquement nul lorsqu'on se sert de faibles volumes de sérum (0,2 cm³, 0,1 cm³...) ou de doses élevées de toxine.

Un sérum humain normal, tantôt peut neutraliser à la fois la collagénase et la lécithinase de la toxine *perfringens* employée dans le titrage, tantôt, il ne peut neutraliser totalement que la collagénase. Le fait est particulièrement net lorsqu'on met en œuvre de petits volumes de sérum (0,5 cm³, 0,2 cm³...).

Des sérums *filtrés* perdent régulièrement une partie de leur action anti-collagénasique naturelle.

Certains sérums employés à la dose de 1 cm³ n'empêchent pas la collagénase *perfringens* de lyser le collagène lorsqu'ils sont titrés en présence de tampon phéniqué, alors qu'ils inhibent l'action de cette collagénase lorsqu'ils sont éprouvés en l'absence de tampon.

2° Le pouvoir anti-collagénasique des *sérums humains normaux* se montre nettement plus faible à l'égard de la collagénase *histolytique*.

Nous n'avons trouvé une action inhibitrice totale que dans quelques cas ; encore opérons-nous avec des quantités énormes de sérum (au minimum : 0,5 cm³) et des doses très faibles de toxine (elles n'ont jamais dépassé 2 doses minima collagénasiques). Dans tous les autres cas, l'action anti-collagénasique des sérums a été nulle ou extrêmement transitoire.

Quelques sérums humains, qui, d'après nos constatations, renfermaient une quantité relativement élevée d'anticollagénase, se sont montrés capables (sous le volume de 0,5 cm³) de protéger

une souris sur deux contre deux doses mortelles de toxine *histolytique*. Un tel phénomène, déjà observé avec des sérums de cheval normaux, tient sans doute partiellement à la richesse en lipides de ces milieux. Mais il est rare. Beaucoup plus souvent, les sérums humains normaux n'ont aucune vertu protectrice à l'égard de la toxine *histolytique*.

B. — Sérums chauffés.

Le pouvoir anti-collagénasique que manifestent les sérums humains normaux vis-à-vis des toxines *perfringens* ou *histolytique* tient-il à la présence d'anticorps naturels ou de simples inhibiteurs ?

C'est pour le savoir que nous avons recommencé les expériences précédentes en utilisant, cette fois, non plus des sérums frais, mais des sérums chauffés à 56°, les recherches sur les anti-hyaluronidases ayant montré que les simples inhibiteurs sont particulièrement thermolabiles.

Voici nos *résultats*.

1° Le chauffage à 56° maintenu pendant trente minutes ou pendant une heure, parfois respecte, parfois supprime complètement le pouvoir anti-collagénasique que possèdent un grand nombre de sérums humains à l'égard de la toxine *perfringens*.

Ce qu'on observe dans la majorité des cas, c'est une simple diminution de l'activité anti-collagénasique.

2° Dans quelques cas, très rares, le chauffage a respecté ou simplement atténué l'action anti-collagénasique des sérums humains vis-à-vis de la collagénase *histolytique*. Presque toujours, il a supprimé cette action, totalement.

De tels résultats autorisent, semble-t-il, à proposer les conclusions suivantes :

a) L'effet anti-collagénasique des sérums humains, en ce qui concerne la toxine *histolytique*, paraît généralement dû à des inhibiteurs ;

b) Au contraire, dans le cas de la toxine *perfringens*, il doit dépendre surtout de véritables anticorps.

Pareilles conclusions, d'ailleurs, n'ont rien qui puisse surprendre puisqu'on sait, depuis longtemps déjà, qu'il existe des anticorps naturels anti-*perfringens* (plus précisément de l'antitoxine α) dans beaucoup de sérums normaux (prélevés par exemple chez le cheval). Ces anticorps naturels auraient pour origine une infection occulte qui, rare par *Cl. histolyticum*, paraît au contraire très fréquente par *Cl. perfringens*.

C. — Sérums provenant de sujets malades.

Les expériences que nous venons d'exposer indiquent que, chez l'homme normal, le titre des anti-collagénases sériques varie

quelque peu d'un sérum à l'autre, mais toujours dans des limites assez étroites.

Peut-on, en revanche, observer des variations importantes (comme cela a été constaté à propos des anti-hyaluronidases naturellement acquises) lorsqu'on opère avec les sérums de *sujets malades* ou soumis à l'action de divers médicaments ?

Ce point était tout particulièrement intéressant à fixer pour le groupe d'affections réunies sous le nom de « *maladies du collagène* », et chez des malades traités par l'A. C. T. H. ou la cortisone.

Nous avons donc examiné — à côté de nos sérums normaux — un grand nombre de sérums pathologiques provenant de sujets atteints de polyarthrite chronique évolutive, de dermatomyosite, de spondylose, d'érythrodermie, de myélomes ou de cancers, et qui, parfois, avaient reçu de l'A. C. T. H. ou de la cortisone.

Mais l'étude de ces sérums n'a révélé aucun fait nouveau puisque nous n'avons jamais observé une teneur en anti-collagénase (vis-à-vis de *Cl. perfringens* et de *Cl. histolyticum*) particulièrement élevée.

Il apparaît ainsi que les maladies du collagène ne peuvent pas être caractérisées d'après le titre anti-collagénasique des sérums.

RÉSUMÉ.

1° *Cl. bifementans* élabore, comme *Cl. perfringens* et *Cl. histolyticum*, une collagénase.

2° Le chauffage des toxines *perfringens*, maintenu pendant cinq minutes, détruit à 70°, et aussi bien à 100°, leur pouvoir collagénasique.

3° Un chauffage modéré (39°) mais prolongé diminue progressivement les activités lécithinasique et collagénasique des toxines anaérobies et, en même temps, leur pouvoir dermonécrosant. Mais celui-ci pouvant subsister après destruction complète de la collagénase, on doit penser qu'il n'est dû que pour une très faible part à cet enzyme.

4° Les sérums humains normaux peuvent renfermer des anti-collagénases capables de neutraliser les diastases correspondantes, élaborées par *Cl. perfringens* ou *Cl. histolyticum*. Cet effet anti-collagénasique est en tout cas peu marqué, même chez les sujets atteints d'une « maladie du collagène », qu'ils soient traités ou non par la cortisone ou l'A. C. T. H., mais il est particulièrement faible vis-à-vis de la toxine *histolytique*. Les anti-collagénases sériques paraissent être constituées tantôt par de simples inhibiteurs, tantôt par des anticorps naturels.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 273 et 794 ; ces *Annales*, 1946, **72**, **12**
et 384 ; *Rev. Immunol.*, 1950, **14**, 9.
- [2] Ces *Annales*, 1950, **78**, 190.
- [3] Ces *Annales*, 1946, **72**, 384.
- [4] *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **229**, 264.

ANTIBIOTIQUES ET LYSÉ BACTÉRIOPHAGIQUE

V. — SUR LA FIXATION ET LA MULTIPLICATION DU PHAGE STAPHYLOCOCCIQUE TWORT EN PRÉSENCE DE LA STREPTOMYCINE

par EWALD EDLINGER (*).

(Institut Pasteur, Service du Bactériophage et C. N. R. S.)

Dans des travaux antérieurs [1, 2, 3, 4] nous avons montré que la streptomycine n'avait pas d'action anti-phage directe, mais que cette substance, ajoutée avant ou en même temps que le phage, retardait sensiblement la lyse du staphylocoque Twort par le phage du même nom. Si on ajoute la streptomycine après le phage, mais avant que la lyse ne commence, on constate que celle-ci s'effectue avec un retard semblable à celui que nous avons indiqué plus haut.

Pour essayer d'élucider la relation hôte-phage dans les phénomènes observés, nous avons étudié l'action de la streptomycine sur la fixation et sur la multiplication de l'agent lytique.

FIXATION DU PHAGE. — Nous avons utilisé le staphylocoque blanc Twort et le phage homonyme. Des cultures de quatre à cinq heures, contenant de $100 \text{ à } 500 \times 10^6$ germes, à 37°C , en eau peptonée, sont additionnées d'un nombre dix à vingt fois moindre de corpuscules bactériophagiques. La moitié de ces cultures reçoit en même temps différentes doses de streptomycine allant de 10 à 200 μg par centimètre cube. L'autre moitié, n'ayant reçu que le phage, sert de témoin. On prélève à différents intervalles 0,1 cm^3 du mélange qu'on dilue dans 10 cm^3 d'eau glacée et on centrifuge. Le liquide surnageant est dilué encore cent fois. IV gouttes de cette dilution sont étalées sur une boîte de gélose préalablement ensemencée avec une suspension assez dense de staphylocoque. En soustrayant le nombre de plages trouvées du nombre obtenu au départ, on connaîtra la quantité de corpuscules fixés.

Nous reproduisons ici le résultat d'une de ces expériences avec

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} juin 1950.

20 μ g de streptomycine par centimètre cube. Les autres doses de l'antibiotique produisent sensiblement les mêmes effets.

Nombre de phages par centimètre cube 15.48×10^6

Nombre de bactéries par centimètre cube 360×10^6

TEMPS minutes	PHAGES FIXÉS P. 100	
	Témoin	20 μ g. de streptomycine par centimètre cube
—	—	—
5	72,7	73,6
10	96	95,3
12	94	100
15	98,2	100
17	90	87
23	81,6	90,4
25	74,4	89
30	23,6	87

Dans les premières minutes, une grande partie des corpuscules est déjà fixée ; la fixation est presque complète après douze à quinze minutes, aussi bien dans le cas du témoin que dans celui du mélange bactérie-bactériophage additionné de différentes doses de streptomycine. Donc la fixation du phage n'est nullement empêchée par l'antibiotique lorsque celui-ci est ajouté en même temps que le phage.

Après dix-sept minutes on observe chez le témoin la libération de nouveaux corpuscules, tandis que la streptomycine semble empêcher la libération. Nous reviendrons ultérieurement sur ce phénomène.

Que se passera-t-il si l'on ajoute la streptomycine avant le phage ? Il convient de faire remarquer auparavant que si l'on ajoute l'antibiotique à une culture bactérienne, on obtient une bactériostase, voire une diminution du nombre des bactéries, tandis que dans la culture-témoin sans streptomycine, la densité bactérienne continue à augmenter.

Il est évident qu'une diminution du nombre des bactéries amoindrit les chances de rencontre entre les phages et les bactéries et, par là même, les chances de fixation du phage. Le pourcentage de la fixation sera donc plus faible que celui de la fixation dans une culture plus dense. Il s'ensuit que l'on ne peut pas comparer les résultats du mélange-témoin bactérie-phage avec celui du mélange qui a reçu auparavant la streptomycine. Nos expériences ont toujours montré une diminution de la fixation pour le mélange bactérie-phage avec streptomycine en comparaison avec le témoin.

Pour obvier à cet inconvénient, nous avons finalement adopté le mode suivant :

La culture bactérienne qui sert de témoin et la culture qui

reçoit la streptomycine sont maintenues à $+4^{\circ}$ C jusqu'à l'adjonction du phage.

D'autre part, nous avons aussi utilisé une culture du staphylocoque Twort streptomycino-résistante avec ou sans streptomycine. Le temps de fixation a toujours été de quinze minutes.

Voici le résultat d'une de ces expériences :

Nombre de phages par centimètre cube $14-17 \times 10^6$
 Nombre de bactéries au départ. $100-120 \times 10^6$

TEMPS de contact avec la streptomycine en heures	STAPHYLOCOQUE Twort + 20 µg. streptomycine au centimètre cube	STAPHYLOCOQUE Twort streptomycino- résistant + 20 µg. streptomycine	STAPHYLOCOQUE Témoin	STAPHYLOCOQUE Twort streptomycino- résistant
0	96,7	98,7	94	100
3	94	96,5	100	91
6	67	89	93	92,5
18	70	92,7	91,8	94
24	56	90,3	89,2	87
48	64	95,4	84	88,6

Si la streptomycine est ajoutée trois heures avant, la fixation est sensiblement la même pour tous les tubes. Mais si la culture du staphylocoque Twort a été en contact pendant six heures ou davantage avec la streptomycine, le taux de fixation est sensiblement diminué. La culture streptomycino-résistante n'est pas influencée par l'adjonction de l'antibiotique. Linz [5] a montré que la streptomycine agit encore aux basses températures et que son action antibiotique devient irréversible après quatre heures.

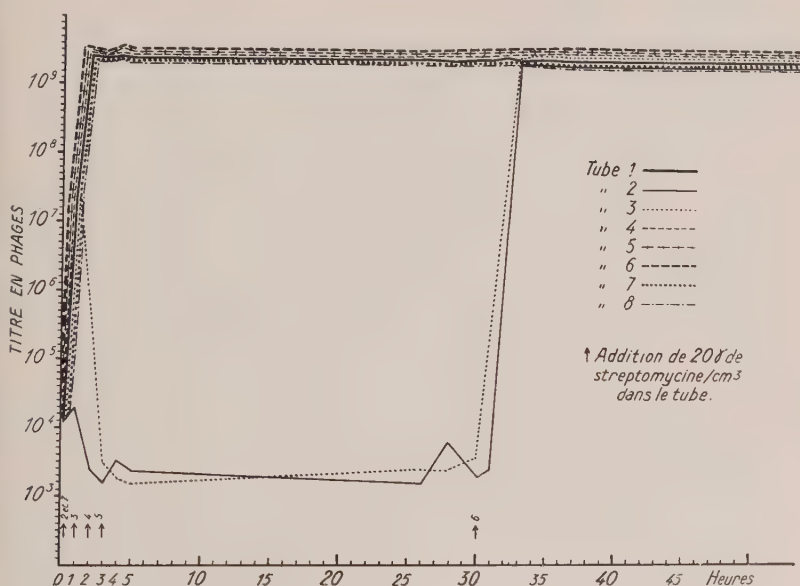
D'après ce résultat, on serait en droit de supposer que les bactéries ayant subi une altération irréversible par la streptomycine, n'ont plus le même pouvoir de fixer les phages et que la streptomycine n'intervient pas directement pour entraver le processus de fixation. Il est plus vraisemblable que la diminution du nombre des bactéries s'effectue encore à 4° C et que, par suite, la fixation est diminuée.

MULTIPLICATION DU BACTÉRIOPHAGE. — Une série de tubes contenant 10 cm^3 d'eau peptonée reçoivent chacun $0,1 \text{ cm}^3$ d'une suspension de 1×10^6 germes d'une culture de staphylocoque Twort de dix-huit heures à 37° C sur gélose inclinée. Ils reçoivent environ 1×10^4 phages Twort par centimètre cube et ils sont mis à l'étuve à 37° C. A différents intervalles, on ajoute 20 µg de streptomycine par centimètre cube. Un tube ne reçoit pas de streptomycine et sert de témoin. Des deux tubes qui reçoivent, dans les mêmes conditions, une culture streptomycino-résistante

de staphylocoque Twort, l'un reçoit la streptomycine en même temps que le phage et l'autre qui ne reçoit que le phage sert de témoin.

Pour les titrages du phage, on prélève de temps en temps 0,1 cm³ de la culture de chaque tube. On effectue la numération des plages obtenues par étalement de la dilution convenable de la culture sur une boîte de gélose préalablementensemencée avec une suspension dense de bactéries.

Les résultats sont condensés sur la figure 1. Le tube 1 (témoin)



Multiplication du phage en présence de streptomycine. Les tubes 1, 2, 3, 4, 5 et 6 contiennent au début de l'expérience 1×10^6 germes de staphylocoque blanc Twort par centimètre cube. Les tubes 7 et 8, la même quantité en mutant streptomycino-résistant. Les tubes 1 et 8 servent de témoins.

montre une augmentation du nombre des phages à 4×10^9 au bout de deux heures. Le tube 2, qui reçoit la streptomycine en même temps que le phage, montre dans la première heure une légère augmentation du titre en phage. Au cours de la deuxième heure, le titre s'abaisse à 4×10^3 pour se maintenir ensuite jusqu'à la trente et unième heure sensiblement au même niveau.

Le tube 3, qui ne reçoit la streptomycine qu'une heure après l'introduction du phage et qui a, à ce moment, le même titre en phage que le tube 1, montre une diminution des phages dans les deux heures qui suivent, au niveau du titre du tube 2. Le

tube 4, qui reçoit la streptomycine deux heures après que le phage a été ajouté et à un moment où la lyse est déjà effectuée, le tube 5 dans lequel on ajoute la streptomycine trois heures après le phage et le tube 6 qui reçoit la streptomycine trente heures après le phage, ne marquent aucun changement dans leur titre en phage, qui reste le même que celui du tube témoin. Enfin, les tubes 7 et 8 qui contiennent une culture streptomycino-résistante et dont le premier a reçu la streptomycine en même temps que le phage, montrent la même augmentation du titre phagique que le tube 1.

A la trente-deuxième heure, les titres en phage des tubes 2 et 3 montent brusquement pour atteindre le titre des autres tubes.

Il résulte de ces chiffres que la streptomycine ajoutée avant la lyse empêche la multiplication du phage et provoque même une diminution du titre, tandis que la streptomycine ajoutée après la lyse ne change pas le titre. Mais cet empêchement n'est qu'un retard temporaire. Ce résultat correspond parfaitement aux observations faites antérieurement au microbiophotomètre (Faguet et Edlinger [4]) d'après lesquelles la lyse est retardée jusqu'à l'apparition de cultures streptomycino-résistantes. Ainsi, dans un mélange bactériophage-bactéries streptomycino-résistantes, l'introduction de l'antibiotique ne retarde pas la multiplication du phage.

Nous avons remarqué, dans nos expériences sur la fixation, que la libération du phage était retardée par la streptomycine. Mais les conditions d'expérience ne sont pas exactement les mêmes dans notre étude sur la fixation et dans celle sur la multiplication. Dans la première, nous n'avons titré que les phages libres, tandis que dans la deuxième expérience on effectue une numération des phages de la culture, c'est-à-dire des « centres infectieux » dont certains peuvent être produits par un phage libre, d'autres par une cellule bactérienne infectée bourrée de corpuscules non encore libérés. Il semble bien que ces conditions ne changent que quantitativement les résultats ; mais il n'est pas possible actuellement de donner plus de précisions à ce sujet.

Le retard infligé à la libération des phages par la streptomycine pourrait expliquer la diminution du titre en phage qui survient dans les tubes 2 et 3 : les phages sont fixés sur des bactéries qui subissent l'action de la streptomycine, et ne sont pas libérés jusqu'au moment de la poussée de la culture streptomycino-résistante. La diminution du titre ne sera donc qu'apparente. En réalité il n'y a qu'une diminution de phages libres et la fixation de plusieurs corpuscules phagiques sur une cellule bactérienne qui, dans le titrage ne donnera qu'une seule plage.

Mais l'éventualité d'une véritable inactivation de phages déjà fixés ne peut pas être exclue. La multiplication postérieure ne

contredit pas cette hypothèse, parce que les phages libres qui sont présents au moment de la reprise de la culture suffisent pour atteindre un titre élevé et provoquer la lyse.

D'autre part, nos observations antérieures au microbiophotomètre nous avaient montré qu'il y a aussi une lyse de cellules bactériennes arrêtées dans leur croissance par la streptomycine. En effet, le degré de la densité bactérienne est plus bas après la lyse que celui qu'on observe pendant l'arrêt de la phase de la croissance. La lyse de la culture en croissance déclenche la lyse de la masse bactérienne totale suivant un processus analogue à celui de la lyse secondaire de Wollman [6]. L'inactivation signalée ne serait donc que temporaire.

En résumé : Dans les conditions de nos expériences, la streptomycine n'empêche pas la fixation des bactéries, mais les phages fixés sur les bactéries qui subissent l'action de cet antibiotique ne peuvent ni être libérés ni se multiplier. Dans une culture streptomycino-résistante, la fixation, la libération et la multiplication des phages se produisent sans entrave en présence de streptomycine.

Le mécanisme de la fixation des phages qui est, comme on le sait, dans une certaine mesure indépendant de l'état de la cellule bactérienne, n'est pas influencé par l'antibiotique, tandis que la libération et la multiplication des phages ne peuvent se produire si les bactéries subissent la bactériostase par l'action de la streptomycine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] EDLINGER (E.). *Ces Annales*, 1949, **76**, 396.
- [2] EDLINGER (E.). *Ces Annales*, 1949, **76**, 559.
- [3] FAGUET (M.) et EDLINGER (E.). *Ces Annales*, 1949, **77**, 204.
- [4] EDLINGER (E.) et FAGUET (M.). *Ces Annales*, 1950, **78**, 144.
- [5] LINZ (R.). *Revue Belge Path. Méd. exp.*, 1948, **19**, suppl. 3.
- [6] WOLLMAN (E.). *Ces Annales*, 1932, **49**, 41.

METHODE DE TITRAGE DE LA SENSIBILITÉ DU *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* AUX ANTIBIOTIQUES

par P.-J. COLETSOS, H. BOISVERT et M^{lle} E. ORIOT (*).

(Institut Pasteur.
Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose.)

Depuis que les antibiotiques sont intervenus dans la thérapeutique des infections, on se préoccupe de l'étude du phénomène de la « résistance » microbienne qui, comme on le sait, se manifeste dans des délais variables, parfois très courts au point de rendre dans ce cas la drogue inopérante et même nuisible.

Les antibiotiques du *Mycobacterium tuberculosis*, la streptomycine de Waksman [1] en tête, n'échappent pas à ce phénomène. Seuls les délais d'apparition de la « résistance » varient suivant la forme, la nature et l'ancienneté des lésions et suivant la constitution et le mode d'action du produit utilisé.

Pour la streptomycine, il a été relativement facile de mettre en évidence le phénomène de la résistance *in vivo* [2], confirmé ensuite *in vitro* [3]. Il en est un peu différemment avec les autres antibiotiques.

Dans l'étude de la résistance du *Mycobacterium tuberculosis* aux antibiotiques, il convient de considérer le point de vue du bactériologiste et celui du clinicien. Ainsi par exemple, pour la streptomycine, alors que le développement de colonies bacillaires en présence de 1, 2 et 5 μg est déjà considéré comme une streptomycino-résistance sur le plan purement bactériologique, ce n'est qu'à 10 μg et au-dessus que ce phénomène revêt une signification clinique.

Cela, parce que les concentrations moyennes de streptomycine dans le sérum sanguin des malades soumis à un traitement standard et par voie parentérale, oscillent autour de 10 μg .

Pour les autres antibiotiques du *Mycobacterium tuberculosis*, les sulfones [4] et le P. A. S. [5] plus spécialement, le seuil de la résistance ayant une signification clinique et qui est de 10 μg pour la streptomycine, n'a pas encore été établi [6].

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 juillet 1950.

Cela se conçoit facilement :

D'une part, parce que le dosage précis de ces deux groupes d'antibiotiques, sous leur forme active, dans le sérum des malades n'est pas très facile à réaliser ;

D'autre part, parce que ces antibiotiques étant administrés par voie orale, dans la majorité des cas, il devient assez malaisé d'escompter pour tous les malades en traitement une courbe de concentration et d'élimination stable.

Cette évaluation devient d'autant plus difficile que, rares sont les malades susceptibles d'observer une discipline rigoureuse dans le rythme d'absorption de l'un ou de l'autre de ces antibiotiques, souvent perturbé d'ailleurs par l'apparition de petits maux (nausées, céphalées, etc.) qui justifient aux yeux du malade et du médecin des écarts appréciables dans la posologie quotidienne de la drogue.

TITRAGE DE LA SENSIBILITÉ DU *Mycobacterium tuberculosis* AUX ANTIBIOTIQUES.

GÉNÉRALITÉS. — Le titrage du *M. T.* aux antibiotiques, en comparaison avec les autres germes, offre des difficultés pour les raisons suivantes :

1° Le *M. T.* est un germe exigeant et relativement difficile à isoler lorsqu'il s'agit d'une première culture ;

2° La « primo-culture » donne des colonies macroscopiques dans des délais assez longs (deux semaines minimum) ;

3° Le *M. T.* se rencontre exceptionnellement à l'état pur dans les *excreta* des malades (expectoration, urine, etc.).

D'où la nécessité :

1° De traiter convenablement et précautionneusement les produits pathologiques et bacillifères avant de les ensemercer, afin de détruire la flore microbienne associée tout en respectant au maximum la *vitalité* des bacilles ;

2° D'ensemencer sur des milieux de culture à la fois *résistants aux surinfections et très sensibles au développement de colonies bacillaires*.

MILIEUX DE CULTURE FAVORABLES AU TITRAGE. — Tous les milieux de culture du *M. T.* peuvent, à la rigueur, servir pour son titrage aux antibiotiques. Cependant, parmi les milieux liquides, les plus aptes et les plus utilisés sont les milieux de Dubos et celui de Youmans.

En principe et à cause des contaminations trop fréquentes, les milieux liquides ne conviennent qu'au titrage indirect, c'est-à-dire en partant de colonies bacillaires déjà isolées sur milieu solide. Jensen, Etienne Bernard et Kreis [7] ont utilisé la méthode de culture sur lame, préconisée par Pryce [8] pour effectuer le titrage direct.

Actuellement, à la lumière des travaux consacrés à l'étude de la streptomycino-résistance, il apparaît nettement que, de préférence, on devrait utiliser les milieux solides chaque fois que cela semble possible.

En effet :

1° Les milieux solides conviennent mieux que les milieux liquides à la « primo-culture » et par conséquent au *titrage direct* ;

2° Le titrage direct sur milieux solides permet d'avoir une appréciation à la fois qualitative et quantitative de souches bacillaires directement isolées du malade ;

3° Le titrage direct *ne fausse pas la composition* et l'aspect de la population bacillaire, ce qui n'est pas le cas lorsqu'on opère sur des milieux liquides et après repiquage ;

4° Les colonies bacillaires sur milieux solides évoluent individuellement et leur étude isolée est ensuite possible ;

5° Les milieux solides contenant du vert malachite et coagulés à des températures supérieures à 56° sont moins exposés que les milieux liquides aux contaminations ;

6° Utilisés pour le titrage direct, ils offrent l'avantage considérable et très appréciable de donner une *réponse rapide*.

Pourquoi les milieux solides n'ont pas encore eu une utilisation plus répandue ?

a) Parce qu'il faut disposer d'un produit bacillifère à l'examen direct. En effet, un titrage effectué avec un produit très paucibacillaire et qui ne donnera que de rares colonies sur le tube témoin, ne peut être considéré comme valable.

Or, les malades traités surtout à la streptomycine voient considérablement diminuer les bacilles dans leurs excréta et en outre un grand nombre de malades, surtout à la phase d'attaque par les antibiotiques (trente premiers jours), éliminent des bacilles altérés, sénescents ou morts incapables de se développer ou dans des délais anormalement longs, parfois supérieurs à deux mois [9].

b) Tous les milieux solides n'offrent pas une égale résistance aux contaminations ni la même sensibilité au développement de colonies bacillaires.

Aux Etats-Unis, les milieux de culture solides les plus utilisés sont :

Le milieu de Hérold gélosé à l'œuf [10] ;

Les milieux de Dubos gélosés [11] ;

Le milieu de l'American Trudeau Society [12] ;

Le milieu de Löwenstein simple ou modifié par Jensen [12].

En principe, tous peuvent être utilisés pour le titrage, mais les milieux qui ne contiennent pas de vert malachite, coagulés

et stérilisés à basse température comme le Dubos gélosé, sont plus exposés aux contaminations que les autres.

Le plus gros handicap du titrage direct sur milieux solides semble être l'addition de l'antibiotique avant la coagulation du milieu et par conséquent le chauffage de l'antibiotique à des températures supérieures à 37°-38°. C'est la réserve que Youmans, Abdulla, J. Sweany et H. Sweany [12] formulent dans l'exposé de leur méthode de titrage direct où les résultats varient d'un laboratoire à l'autre.

Nous partageons d'autant plus leur avis que nous nous sommes heurtés au même inconvénient dans la première méthode de titrage direct que nous avons étudiée avec J. Bretey et H. Boisvert [13], qui était comparable à celle décrite par Karlson et Needham [14] et à celle des auteurs ci-dessus cités.

La méthode que nous avons préconisée et mise au point en collaboration avec H. Boisvert [15] pour le titrage du *M. T.* à la streptomycine et dont l'originalité consiste en l'imprégnation des milieux de culture par l'antibiotique en surface :

a) Permet d'éviter tout chauffage de l'antibiotique au-dessus de 37°-38° ;

b) Renforce le pouvoir antiseptique des milieux et

c) Ramène presque extemporanément par évaporation les solutions d'antibiotiques introduites dans les tubes à l'état semi-solide.

Est-ce là l'explication du fait que le titrage du *M. T.* par cette méthode se montre très stable et précis, même lorsqu'il s'agit d'antibiotiques de synthèse tels que le P. A. S. et les sulfones (?), alors qu'il est difficile d'effectuer un titrage rigoureux avec ces antibiotiques en milieux liquides ?

Est-ce aussi dû au fait que la culture en présence de ces antibiotiques s'effectue entièrement en surface et au contact direct de l'air ?

Ce sont là des questions que nous étudions actuellement, mais nous n'avons pas encore une opinion définitive ; cependant, le fait nous incite à chercher une explication.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE. — *Matériel humain ou animal.* — On peut utiliser des produits de toute nature, à condition qu'ils soient bacillifères au frottis direct.

Si les produits sont stériles (liquide céphalo-rachidien, liquide pleural, etc.), ensementer directement.

Si les produits sont contaminés, ensementer après traitement au mortier par la soude à 4 p. 100, séjour à l'étuve pendant une heure et neutralisation à l'acide sulfurique à 4 p. 100.

Pour les produits à faible concentration bacillaire, il y a lieu de procéder à l'homogénéisation et d'utiliser le culot de centrifugation.

Matériel de laboratoire. — Utiliser des milieux solides et de préférence le milieu de Löwenstein-Jensen glycérimé, ou le milieu de Dubos gélosé simple ou additionné de jaune d'œuf, ou tout autre milieu solide : Petraghani, milieu de Hérolé gélosé à l'œuf, etc. Ces milieux doivent être distribués et coagulés dans des tubes à fond plat et à large surface dits « tubes de Legroux ».

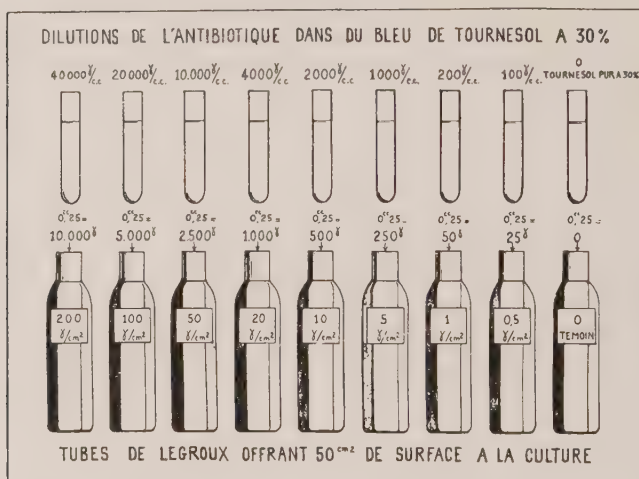
PRÉPARATION DES DILUTIONS. — L'imprégnation des milieux de culture par l'antibiotique, s'effectuant en surface, c'est l'étendue de celle-ci en centimètre carré qui servira de guide pour préparer les dilutions correspondantes.

Le tableau I indique en haut les concentrations convenables d'antibiotiques exprimées en μg et au centimètre cube.

Les chiffres du milieu indiquent le nombre de μg qui sont contenus dans $0,25\text{ cm}^3$ de chaque dilution.

Les chiffres qui figurent sur les tubes indiquent la concentration finale d'antibiotique par centimètre carré de milieu.

TABLEAU I.



La gamme des dilutions indiquées dans le tableau I a été prévue pour des tubes plats de « Legroux » offrant 50 cm^2 de surface à la culture.

Il sera très facile de la modifier si on utilise des tubes ou fioles offrant une surface inférieure ou supérieure à 50 cm^2 .

Ce sur quoi nous insistons particulièrement, c'est qu'il ne faut se servir que de tubes, fioles ou boîtes à surface plane et régulière.

L'utilisation de la méthode en dehors de ces conditions (sur

tubes cylindriques par exemple) entraîne des variations très appréciables dans l'imprégnation du milieu et par conséquent dans les résultats.

EQUIVALENCE EN μg (MICROGRAMMES) ET UNITÉS. — I. *Pour la streptomycine.* — $1 \mu\text{g} = 1$ unité Waksman (U. W.).

Introduire dans le flacon de streptomycine la quantité d'eau bidistillée stérile indiquée sur la notice pour obtenir une solution mère à 100.000 μg par centimètre cube.

Utiliser des tubes de Legroux titrant 1, 5, 10, 20 et 50 μg au centimètre carré plus un témoin.

II. *Pour le P. A. S.* — Il faut calculer en μg . Comme on utilise généralement un sel de soude, sa teneur en P. A. S. actif varie ; il faut donc être renseigné sur ce point par le fabricant.

Par exemple : il faut peser 1,381 g. de P. A. S. de sodium (Spécia) pour avoir 1 g., soit 1.000.000 μg de P. A. S. actif.

Pour avoir une solution de 100.000 μg : mettre 1,381 g. de P. A. S. de sodium dans une fiole jaugée à 10 cm^3 ; dissoudre d'abord dans 5 cm^3 puis compléter à 10 cm^3 .

A conserver à la glacière et à l'abri de la lumière. Il est préférable d'éprouver sa stérilité en ensemençant III gouttes dans un tube de bouillon quarante-huit heures avant de s'en servir.

Utiliser les tubes de Legroux titrant 0,2, 0,5, 1, 5 et 10 μg au centimètre carré plus un tube témoin.

III. *Pour la néomycine* (1) [16]. — Il faut calculer en unités ; l'équivalence entre μg et unités n'étant pas fixe pour tous les échantillons.

Pour nos titrages, nous nous sommes servis d'un échantillon de néomycine qui titrait 0,20 U. pour 1 μg . Utiliser les tubes de Legroux titrant 10, 20, 50, 100 et 200 unités de néomycine plus un tube témoin.

IV. *Pour les sulfones.* — Le calcul et le titrage sont beaucoup plus délicats et difficiles. Ce qu'on doit rechercher, c'est d'avoir à partir d'un produit connu, son équivalence en sulfone mère ou 1358 F, produit actif qui, lui, pur, n'est pas soluble dans l'eau et par conséquent impossible à utiliser pour le titrage.

Pour le titrage, nous avons utilisé l'exosulfonyl chirurgical (1500 F), solution à 50 p. 100 (Théraplix).

Utiliser les tubes de Legroux titrant 200, 500 et 1.000 μg au centimètre carré plus un tube témoin.

TECHNIQUE. — Prendre une série de tubes de milieu fraîche-

(1) Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements à la Direction de l'Institut Pasteur et à M^{me} Grumbach, d'avoir bien voulu nous céder une part de la faible quantité de néomycine que le professeur Waksman, son inventeur, a mis à la disposition de l'Institut dans un but de recherches.

ment coagulé. Les disposer à l'envers et inclinés de telle sorte que la solution d'antibiotique s'accumule dans le fond des tubes contre la paroi de verre, sans contact avec le milieu.

Retourner ensuite les tubes un par un de façon à étaler la solution tournesolée en commençant par le fond.

Par des mouvements latéraux et une inclinaison de plus en plus accentuée vers l'ouverture du tube, le liquide progresse régulièrement et recouvre en s'épuisant toute la surface du milieu.

Maintenir les tubes en position horizontale. Recommencer l'opération si nécessaire une ou deux fois. Placer enfin les tubes à l'étuve à 37° pendant quelques heures pour achever l'imprégnation.

L'évaporation étant obtenue et les milieux uniformément bleutés sur toute la surface, ensementer les produits à étudier comme pour une culture normale.

Il est très important d'ensemencer avec la même pipette et de préférence avec une pipette graduée, exactement la même quantité d'inoculum dans tous les tubes (XV gouttes suffisent).

Boucher sans trop enfoncer le coton dans le tube, capuchonner et placer à nouveau horizontalement à l'étuve à 37°.

RÉSULTATS. — A partir du septième ou huitième jour, on peut avoir une appréciation de l'état de résistance à l'antibiotique utilisé par la recherche au microscope des « colonies bacillaires naissantes », au moyen d'un frottis effectué par raclage des milieux.

Au microscope, on doit toujours trouver des « colonies naissantes » sur les tubes témoins. S'il en est de même pour les tubes additionnés d'antibiotique, il faut remonter progressivement des titres les plus faibles aux plus forts, jusqu'à ce qu'on ne trouve plus de « colonies naissantes » ; le dernier tube positif indique le taux minimum de résistance pour le jour où l'examen a été pratiqué.

Remarque : en aucun cas, les unités ou même les amas bacillaires constatés sur frottis de raclage de culture, ne doivent être considérés comme un développement bacillaire. Seule, la constatation nette de plusieurs groupements bacillaires, en torsades, écheveaux ou circonvolutions, autorise à conclure à l'existence de colonies bacillaires naissantes.

Lecture macroscopique. — Dans la majorité des cas, à partir du quinzième jour, quelquefois avant, on constate l'apparition de fines colonies bacillaires dont l'aspect punctiforme et brillant contraste avec le fond bleu du milieu imprégné de tournesol.

Le temps optimum pour la lecture macroscopique est situé entre la troisième et la quatrième semaine (fig. 1, 2 et 3).

Les contaminations sont rares, à peine 4 p. 100 au total de nos cas, sans entraîner obligatoirement la perte de la souche.

Remarques. — Ce n'est pas toujours le tube témoin qui donne des colonies apparentes en premier.

Nous avons remarqué dans 3 p. 100 des cas, tous se référant

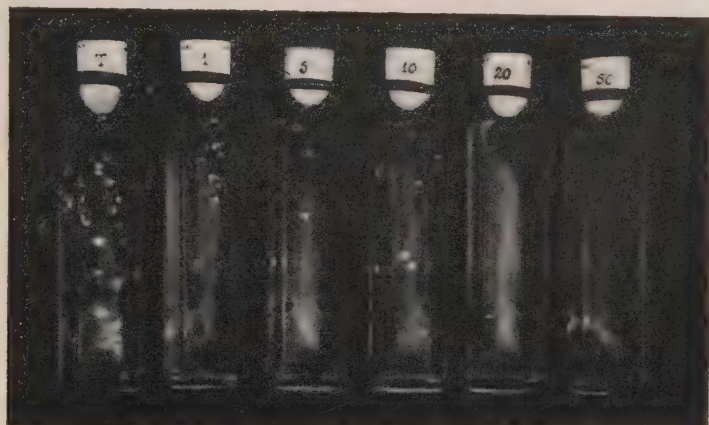


FIG. 1. — Titrage direct expect..., n° 102. Résistance partielle à 1, 5 et 10 μ g.
Une seule colonie à 20 μ g.



FIG. 2. — Titrage direct expect..., n° 112. Résistance partielle à 10 μ g.
Sensibilité totale à 20 μ g.

d'ailleurs à des malades en traitement depuis longtemps et streptomycino-résistants, une certaine avance dans le développement initial de colonies macroscopiques sur les tubes imprégnés avec de très faibles concentrations de streptomycine.

Il est à préciser, toutefois, que cette avance n'est qu'éphémère et d'une durée exceptionnellement supérieure à dix jours.

S'agit-il, en l'occurrence, d'un phénomène de stimulation des bacilles par l'antibiotique ? Nous le pensons d'autant plus que certains de ces malades ont reproduit ce phénomène et deux et même trois titrages successifs.

Sur 2.000 titrages à la streptomycine, quatre fois le tube témoin et le tube streptomyciné à 1 μ g au centimètre carré étaient restés négatifs, alors que les tubes streptomycinés à 5, 10 et 50 avaient donné de nombreuses colonies. Nous avons pensé qu'il s'agissait d'un phénomène de *dépendance*. A la vérification par repiquage des colonies sur milieux solides et liquides, cette dépendance s'est révélée instable et éphémère.

LIMITE DE LA SENSIBILITÉ DU *Mycobacterium tuberculosis* AUX



FIG. 3. — Titrage direct expect..., n° 113. Résistance massive à 50 μ g.

ANTIBIOTIQUES CI-DESSUS MENTIONNÉS. — 1° *A la streptomycine*. — Par la méthode que nous préconisons, la sensibilité normale du *M. T.* à la streptomycine se situe, à part de rares exceptions, à 1 μ g au centimètre carré.

Ce fait a été vérifié sur un nombre considérable de titrages (2.000).

2° *Au P. A. S.* — La sensibilité normale au P. A. S. éprouvée sur des bacilles isolés directement du malade et sur des souches de laboratoire humaines virulentes, s'avère située à 0,5 μ g au centimètre carré.

Nous n'avons pas constaté une différence appréciable de sensibilité au P. A. S. entre les souches résistantes et sensibles à la streptomycine.

Au cours de nos titrages effectués chez des malades traités, un seul s'est révélé résistant à la fois au P. A. S. et à la streptomycine à plus de 250 μ g.

3° *A la néomycine.* — Notre expérience se limite uniquement à des souches de laboratoire.

Leur sensibilité a été la suivante :

Pour le BCG normal et le BCG streptomycino-résistant, à 10 unités, soit à 50 μ g au centimètre carré pour l'échantillon de néomycine utilisé.

Pour la H37Rv et la H37Rv streptomycino-résistante, la Brévannes normale et la Brévannes streptomycino-résistante, la Leysin, la 141 I. P. et la Duprey S. : l'inhibition a été partielle à 10 et 20 unités. Pas de différence notable entre souches streptomycino-résistantes et streptomycino-sensibles.

4° *Aux sulfones.* — Il est à préciser que le titrage aux sulfones n'a pas encore trouvé sa solution définitive.

Les résultats peuvent varier suivant le produit utilisé, l'équivalence de chacun d'eux en sulfone mère étant davantage théorique que réelle.

Il est donc indispensable que tout titrage effectué dans un but clinique ou de recherches comporte l'ensemencement simultané d'une souche témoin. Jusqu'à nouvel informé, c'est par rapport à une ou plusieurs souches témoins que la sensibilité ou la résistance sera évaluée et sans aucun rapport avec la concentration de produit actif (sulfone mère) dans les humeurs de l'organisme traité.

C'est la discipline que nous avons observée en cherchant la résistance sur 20 d'un groupe de 50 malades traités à la 4-4'-diamino-diphénylsulfone (Disulone) à raison de 150 mg. par jour depuis cinq mois.

Parallèlement, nous avons éprouvé la sensibilité du BCG de la souche H37Rv et Brévannes.

Dans les conditions auxquelles nous avons opéré nos titrages, la sensibilité s'est située entre 200 et 500 μ g au centimètre carré de « sulfone mère ».

Nous n'avons pas encore trouvé, parmi les 20 malades traités, un seul sulfono-résistant.

EN CONCLUSION : La méthode de titrage que nous préconisons, expérimentée sur plus de 2.000 cas, assure, dans des délais très courts et avec une grande précision, l'étude de la sensibilité et de la résistance du *Mycobacterium tuberculosis* aux antibiotiques actuellement en usage : streptomycine, P. A. S., néomycine et accessoirement les sulfones.

Elle se révèle, en outre, comme un procédé de choix pour l'étude des antibiotiques dans les laboratoires de recherches et d'application.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. A. WAKSMAN, E. BUGIE et A. SCHATZ. *Proceed. Staff. Meet., Mayo Clinic*, 1944, **19**, 537.
A. SCHATZ et S. A. WAKSMAN. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1944, **57**, 244.
- [2] G. YOUNG, WILLISTON, FELDMAN et HINSHAW. *Proceed. Staff. Meet., Mayo Clinic*, 1946, **21**, 126.
- [3] WILLISTON et YOUNG. *Am. Rev. Tub.*, 1947, **55**, 536.
E. LONG. *Bull. Union Internat. contre la Tuberculose*, 1950, **20**, 269-297.
F. GRUMBACH (M^{me}). In : *Techniques de Laboratoire en Pneumologie*. J. C. LEVADITI et B. KREIS, Flammarion, édit.
B. SUREAU et Y. CHABBERT. *Biol. Méd.*, 1948, **37**, n^{os} 1-2.
- [4] E. FOURNEAU, J. TRÉFOUËL, F. NITTI, D. BOVER et M^{me} TRÉFOUËL. *C. R. Acad. Sci.*, 1937, **204**, 1763.
N. RIST, F. BLOCH (M^{lle}) et V. HAMON (M^{lle}). *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 972.
N. RIST et J. COTTET. *Presse Méd.*, 1949, **57**, n^o 52, 743.
F. BOYER, N. RIST et M. SAVIARD. *Ces Annales*, 1949, **77**, 680.
- [5] F. BERNHEIM. *Science*, 1940, **92**, 104 ; *J. Bact.*, 1941, **41**, 387.
J. LEHMANN. *Lancet*, 1946, **5**, 250.
- [6] G. WIDSTRÖM et SWEDBERG. *Nordisk Med.*, 1947, **36**, 2148.
A. DELAUDE, A. G. KARLSON, D. J. CARR, W. H. FELDMAN et K. PFUETZE. *Proceed. Staff. Meet., Mayo Clinic*, 1949, **24**, 341.
E. BOGEN, N. RUSSEL, LOOMIS et DRAKE W. WILL. *Am. Rev. Tub.*, 1950, **61**, 226.
- [7] E. BERNARD et B. KREIS. *Rev. Tub.*, 1949, **13**, 334.
- [8] D. M. PRYCE. *J. Path. a. Bact.*, 1941, **53**, 327.
- [9] P. J. COLETOS. *Rev. Tub.*, 1949, **13**, n^{os} 11-12.
- [10] R. D. HEROLD. *J. Infect. Dis.*, 1931, **48**, 236-241.
- [11] R. J. DUBOS et G. MIDDLEBROOK. *Am. Rev. Tub.*, 1947, **56**, 334.
- [12] G. YOUNG, I. ABDULLA, J. SWEANY et H. SWEANY. *Am. Rev. Tub.*, 1950, **61**, 569-581.
- [13] J. BRETEY, P. J. COLETOS et H. BOISVERT. *Ces Annales*, 1949, **76**, 118.
- [14] A. G. KARLSON et G. M. NEEDHAM. *Proceed. Staff. Meet., Mayo Clinic*, 1948, **23**, n^o 18.
- [15] P. J. COLETOS et H. BOISVERT. *Rev. Tub.*, 1949, **13**, 344-346.
- [16] S. A. WAKSMAN et H. A. LECHEVALIER. *Science*, 1949, **109**, 305.

RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES SUR *ENDOSPORUS AZOTOPHAGUS*

(TCHAN ET POCHON 1950)

FIXATEUR D'AZOTE

(PREMIER MÉMOIRE)

par Y.-T. TCHAN (*).

(Institut Pasteur. Laboratoire de Microbie technique.)

Depuis les travaux de Winogradsky et Beijerinck, la fixation de l'azote moléculaire par les micro-organismes aérobies et anaérobies est un fait bien connu, mais le nombre des espèces qui en sont responsables est resté longtemps réduit. Cependant, les recherches récentes montrent qu'un grand nombre de germes du genre *Clostridium* possèdent cette fonction [1] ainsi que certains germes photosynthétiques [2]. La source d'azote pour ces derniers germes ne peut être uniquement moléculaire et le milieu de culture doit contenir une petite quantité d'azote combiné. Le pouvoir de proliférer sur un milieu strictement sans azote combiné apparaît comme l'apanage de *Cl. pastorianum* [3] et des *Azotobacter*.

De ce fait, il faut encore considérer que la fixation de l'azote au sein d'un sol pauvre en azote, est surtout l'œuvre des *Azotobacter* et de *Cl. pastorianum*. On connaît relativement bien les conditions d'activité des *Azotobacter* dans la terre [4], mais on ignore presque complètement celles de *Cl. pastorianum*. Néanmoins, Winogradsky a montré que les sols argileux peuvent contenir ces derniers à l'état actif quand l'humidité est suffisante. Nous avons également précisé que les conditions de rH du sol peuvent, dans certains cas, être favorables aux microbes anaérobies de la terre [5]. Donc, il n'est pas exclu que les anaérobies fixateurs puissent contribuer à la constitution de la réserve azotée du sol.

Winogradsky a indiqué que *Cl. pastorianum* n'utilise pas la mannite comme source de carbone, du moins la souche qu'il a étudiée en 1902 [2]. Cependant, en 1926, il emploie la mannite pour rechercher le *Clostridium* fixateur d'azote dans le sol. Il

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} juin 1950.

signale que les souches isolées ont des caractères différents, mais l'étude de celles-ci n'a pas été poussée assez loin pour pouvoir les identifier. Afin de mieux connaître le comportement de ces germes, nous nous sommes proposé de les isoler et de les étudier.

Une grande plaque de silico-gel est imprégnée de mannite et de solution de Winogradsky. On ensemente avec des grains de terre préalablement chauffée à 60° pendant vingt-quatre heures. L'incubation se fait à 30° dans une cloche à vide où l'on a éliminé l'O₂ par un mélange d'acide pyrogallique et de soude (technique de Winogradsky). Au bout de trois jours, nous obtenons une culture mixte où domine un microbe de forme clostridienne. Après plusieurs passages sur du silico-gel dans les mêmes conditions, nous ne sommes pas arrivé à purifier ceux-ci d'une façon satisfaisante. L'isolement sur gélose aux sels minéraux et à la mannite n'a donné aucune culture. C'est en chauffant une culture mixte à 80°, issue d'un milieu liquide, que nous avons obtenu la souche pure.

Dès la première tentative d'identification, on constate que ce germe diffère de *Cl. pastorianum*, car il ne prend pas le Gram et sa culture ne donne pas l'odeur caractéristique de l'acide butyrique.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

Nous n'indiquons ici que les caractères essentiels déterminatifs, réservant pour plus tard l'étude cyto-morphologique plus détaillée.

Les cellules jeunes sont droites ou légèrement incurvées, de 4 à 6 μ $\times$ 0.7 μ , mobiles et à flagelles péritriches.

L'affinité tinctoriale pour le Gram est nulle. Ceci est très important car ce caractère seul suffit à le classer non pas comme un *Clostridium*, mais comme un *Endosporus*. (Pour être certain des résultats de technique de Gram, nous avons incorporé à notre souche une suspension de *Corynebacterium diphtheriae* et celle d'un *Azotobacter*. Après la coloration, notre germe est Gram — avec les *Azotobacter* : quant au *Corynebacterium*, il est resté Gram +.) L'examen à l'état frais en présence d'iode ne nous a pas révélé la présence de granules iodophiles dans les cellules.

Au bout d'une semaine de culture, on voit apparaître les spores déformant la cellule, qui prend alors une forme clostridiale. Ces spores résistent très bien à 100° C pendant trois minutes mais retiennent assez mal la fuchsine dans la coloration de Ziehl.

La germination des spores dans des conditions favorables est très rapide — une dizaine de minutes environ. La température limite de la culture est de 20 à 39° avec un optimum de 33°. A 55° on n'a plus de culture.

CARACTÈRES PHYSIOLOGIQUES.

Le point qui attire notre attention est l'échec de l'isolement sur un milieu gélosé. En effet, sur les milieux usuels, tels que : gélose profonde, eau peptonée, sérum coagulé, gélose et bouillon V.F., gélatine, eau peptonée sucrée, on n'obtient aucune culture, même après plusieurs jours. Par contre, la culture sur ces milieux devient possible si l'on dilue l'eau peptonée avec la solution saline de Winogradsky. Ce fait trouvera une explication partielle après l'étude du pH.

I. — *Rôle du pH.*

On établit une gamme de pH avec le tampon classique au phosphate de Sørensen, allant de pH 5.2 à pH 8.0. Les autres sels minéraux sont ajoutés sous forme de solution standard de Winogradsky privée de phosphate. Le CO_3Ca est remplacé par le Cl_2Ca . La source de carbone est constituée par du mannitol à la concentration de 5 g. par litre. Ce milieu est impropre à la culture de notre germe car sa teneur en phosphate est trop élevée (1 p. 100 environ). On est obligé de diluer ce milieu minéral quarante fois au détriment de la stabilité du pH pour obtenir un milieu favorable à la croissance. Dans ces conditions on peut déterminer l'optimum de pH.

	pH	5,3	5,6	5,9-6	6,2	6,5	6,6-6,7
Culture. .	2 jours.	±	+	+	++	++	++
	8 jours.	+	+	+	++	++	++
	pH	6,8	6,9-7,0	7,2	7,4	7,7	8,0
Culture. .	2 jours.	++	++	+	—	—	—
	8 jours.	++	++	+	—	—	—

Notre souche préfère donc un milieu légèrement acide : pH entre 6,2 et 7,0.

Cette étude du pH permet d'expliquer un certain nombre de faits. D'abord les milieux usuels de laboratoire sont ajustés à pH = 7.3-7.4. Ce pH est défavorable à la pullulation de notre germe et permet d'expliquer les échecs de culture sur ces milieux. En effet, quand ils sont dilués par la solution saline de Winogradsky (pH voisin de 7.2) on abaisse le pH de ces milieux et ainsi la culture devient possible. Un autre fait vient appuyer

cette interprétation. On peut obtenir des cultures sur ces milieux usuels à condition de les ensemercer avec 0,5 cm³ d'une vieille culture de pII = 5.8 sur milieu liquide sucré (milieu salin additionné de sucre). En effet, il s'y est accumulé des acides de fermentation et ces acides permettent d'abaisser suffisamment le pII pour favoriser la culture.

Enfin, signalons en passant qu'une concentration trop élevée en éléments minéraux pouvant être nuisible à la croissance de notre germe, il est préférable, si on veut entretenir notre souche sur du silico-gel stérile, de n'utiliser que du silico-gel lavé à l'exclusion des gels de silice obtenus avec l'acide phosphorique sans dialyse.

II. — Rôle de l'oxygène.

Abordons maintenant la tolérance vis-à-vis de l'oxygène. Cette étude nous permet d'apprécier l'action des germes dans les différents sols et dans les diverses conditions (humidité, plasticité, etc.). Dans un tube de gélose profonde lavée, additionnée de sels minéraux et de mannite, on ensemece une suspension bactérienne ; au bout de quarante-huit heures on peut apercevoir de petites colonies depuis le fond du tube jusqu'à la surface. Après trois ou quatre jours, ces colonies augmentent de volume, devenant lenticulaires sans produire de gaz. Dans la zone microaérophile, la culture est légèrement plus abondante. Cette expérience montre deux faits intéressants. D'abord, ce microbe est capable de fixer l'azote moléculaire en présence ou en absence d'oxygène et, *a priori*, dans toutes conditions de rH du sol. Cependant, son besoin en azote moléculaire en absence d'azote combiné et sa préférence à pulluler dans la zone microaérophile font penser à une légère tendance à fuir une trop grande tension d'oxygène libre. Il travaillera en légère anaérobiose dans la nature. D'autre part, nous avons signalé que notre souche ne cultive pas sur un support gélosé et pourtant, ici, l'expérience a été réalisée sur gélose profonde. Le fait que la gélose a été lavée facilite sa croissance ; néanmoins, il ne suffit pas à lui seul pour expliquer ce phénomène, car, après plusieurs repiquages, nous sommes arrivé à cultiver notre souche sur la gélose non lavée. Il y a certainement une sorte de modification physiologique à la suite des entretiens prolongés sur un milieu artificiel.

III. — Aliments carbonés et type fermentaire.

Quelle source de carbone notre germe est-il capable d'utiliser au sein du sol ? Nos essais sont faits en absence d'azote combiné. Il est logique de supposer que les fixateurs d'azote prolifèrent au maximum, en présence d'autres germes du sol, dans le cas

où l'azote combiné est déjà complètement épuisé. Les résultats obtenus dans ce cas sont plus près des conditions naturelles.

Nous avons utilisé un milieu minéral de base de composition suivante :

Phosphate monopotassique	0,25
SO ₄ Mg.	0,10
SO ₄ Fe.	0,01
SO ₄ Mn	0,01
Cl ₂ Ca.	0,10
H ₂ O.	1.000

ajusté à pH 6.8 avec la soude N/20. Ce milieu est additionné de différents sucres et acides volatils et fixes (sous forme de sel de sodium) ou d'alcools, à la concentration finale de 0,5 p. 100 et ensemencé avec quelques gouttes d'une culture très jeune ; on détermine le pH après sept jours d'incubation pour les sucres et l'appréciation de la turbidité pour les alcools ou les acides.

Voici les résultats obtenus :

pH	Mannitol. 5,8	Lactose. 5,8	Galactose. 5,6	Saccharose. 5,6	Lévulose 5,6
pH	Glucose. 5,6	Glycérine. 6,8	Arabinose. 6,8	Amidon. 6,8	Xylose. 6,8
	Alc. éthylique. —	Alc. butyl. —	Alc. isobuty. —	Alc. isoamyl. —	
	Acétone. +	Oxalate. ++	Lactate. ++	Succinate. —	Benzoate. ++
	Butyrate. ±	Pyruvate. ++	Citrate. +	Formiate. +	Acétate. +

±, très léger développement; +, développement moyen; ++, bon développement.

En utilisant le glucose comme sucre, nous avons déterminé le type fermentaire et le rendement de fixation. Le choix du glucose a été fait en vue de comparer nos résultats à ceux obtenus par divers auteurs avec les *Azotobacter* et le *Clostridium pastorianum*.

En utilisant la méthode de Duclaux nous avons trouvé dans une culture âgée de quinze jours (milieu synthétique à 1 p. 100 de glucose) de l'alcool éthylique, acide formique et acide acétique (dans le rapport de 2 formique pour 1 acétique). La recherche de l'aldéhyde et de l'acétone reste négative.

Si l'on prolonge le temps de culture, la teneur en acide acétique du milieu diminue et finit par disparaître presque complètement. Ceci n'a rien d'étonnant, notre souche pouvant utiliser l'acétate comme source de carbone. En milieu acide, on peut extraire par l'éther une trace de substance, insoluble dans l'eau distillée,

soluble dans les solvants organiques. Sa nature chimique n'a pas pu être déterminée.

Aucun acide fixe n'a pu être mis en évidence dans le milieu de culture ; ceci tient peut-être au fait que la plupart de ces acides sont utilisables comme source de carbone par notre germe.

Pour déterminer le rendement de fixation, nous avons utilisé des fioles bouchées afin d'éviter l'entrée de l'ammoniac dans le milieu de culture [7]. En dosant le sucre par la méthode de Bertrand et l'azote total par la méthode de Kjehldal avant et après la culture, nous avons trouvé :

AVANT L'INCUBATION		APRÈS 9 JOURS D'INCUBATION	
N total	Sucre	N total	Sucre
0,412 mg. par 100 cm ³ .	340 mg.	0,392 mg.	400 mg.

$$\text{Rendement de fixation : } \frac{0,28}{110} = 2,54 \text{ p. 1.000.}$$

Ce rendement est satisfaisant car il est intermédiaire entre celui de *Cl. pastorianum* (1 p. 1.000) et celui d'*Azotobacter* (1 p. 100).

Rôle œcologique.

La tolérance d'*E. azotophagus* vis-à-vis de l'oxygène libre lui permet d'exercer son activité dans les conditions du sol les plus diverses (humidité, aération, teneur en argile..., etc.). Dans des terres légères, nous ne pensons pas qu'il lui soit possible de concurrencer les *Azotobacter* dont la vitesse de croissance est très supérieure. Quand la terre est saturée d'eau, notre germe est certainement capable de fixer l'azote atmosphérique au même titre que le *Cl. pastorianum*. Dans les cas intermédiaires, son activité n'est pas négligeable.

Cependant dans certains cas particuliers, il est même capable, *a priori*, de se substituer aux *Azotobacter*. En effet, l'arrêt d'une fermentation banale et très active par les germes zymogènes du sol, arrêt dû à l'épuisement de l'azote combiné, laisse une quantité abondante d'acides volatils et fixes ; le pH local peut se trouver abaissé. Par suite de la respiration intense de ces ferments, le rH pourrait tomber assez bas. Ces conditions sont particulièrement défavorables aux *Azotobacter*, mais avantageuses pour la multiplication de notre germe et la fixation de l'azote moléculaire.

CONCLUSION.

L'ensemble des caractères morphologiques de notre germe, son pouvoir fixateur et son type fermentaire nous permettent de le

différencier de *Cl. pastorianum* et confirment notre proposition antérieure.

Voici le résumé de ces caractères :

MORPHOLOGIE. — Bâtonnet mobile, à cils péritriches, de 4 à 6 μ de long sur 0.7 μ de large. Les cellules jeunes sont droites ou légèrement incurvées. Les cellules âgées présentent une spore subterminale, clostridienne. Cette spore retient assez mal le Ziehl. Le germe ne contient pas de granules iodophiles. Il ne se colore pas par la méthode de Gram.

PHYSIOLOGIE. — Le germe fixe l'azote moléculaire. Il ne cultive pas sur les milieux suivants : gélose profonde, eau peptonée, sérum coagulé, gélose et bouillon V.F., gélatine (au moins pour la souche fraîchement isolée).

Sur milieu synthétique minéral sans azote, les glucides suivants sont utilisés : glucose, saccharose, lactose, galactose, mannitol. Ne sont pas utilisés : arabinose, xylose, amidon, glycérol.

Les peptones sont utilisées à condition que la concentration ne dépasse pas 7 à 8 p. 1.000. Les nitrates sont utilisés mais non réduits. La prolifération n'a lieu sur gélose que si celle-ci a été parfaitement lavée. En particulier, en gélose profonde (lavée) additionnée de sels minéraux et de mannitol, sans azote combiné, la répartition des colonies est du type anaérobie et microaérophile, et celles-ci sont lenticulaires, sans formation de gaz.

La température optima de culture est de 33° (pas de culture à 55°). Son pH optimum se trouve entre 6.4 et 6.8. Les spores résistent cinq minutes à 100°.

Type fermentaire : alcool, acide formique, acide acétique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ROSENBLUM (E. D.) et WILSON (P. W.). *J. Bact.*, 1949, **57**, 413.
- [2] LINDSTRÖM, BURRIS et WILSON. *J. Bact.*, 1949, **58**, 313.
- [3] WINOGRADSKY (S.). *Microbiologie du Sol*. Masson et C^{ie}, Paris, 1949.
- [4] WINOGRADSKY (S.). *Microbiologie du Sol*. Masson et C^{ie}, Paris, 1949.
- [5] POCHON (J.) et TCHAN (Y.-T.). *Précis de Microbiologie du Sol*. Masson et C^{ie}, Paris, 1948.
- [6] WINOGRADSKY (S.). *Microbiologie du Sol*. Masson et C^{ie}, Paris, 1949, p. 357.
- [7] KAUFFMANN (J.), POCHON (J.) et TCHAN (Y.-T.). *Ces Annales*, 1948, **75**, 83.
- [8] PRÉVOT (A.-R.). *Manuel de classification des Anaérobies*. Masson et C^{ie}, Paris, 1949.
- [9] TCHAN (Y.-T.) et POCHON (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 417.

LA PYRIMIDINE. FACTEUR DE CROISSANCE POUR LES *SPOROTRICHUM* (1).

par E. DROUHET et F. MARIAT.

[Institut Pasteur,
Service de Physiologie végétale et de Mycologie (*).]

Les *Sporotrichum* sont des champignons pathogènes appartenant aux *Fungi imperfecti*. On classe fréquemment ces champignons dans le genre *Rhinocladium*, mais, comme les différents auteurs sont très divisés sur ce point de nomenclature — certains adoptant *Sporotrichum*, d'autres *Rhinocladium*, d'autres enfin *Rhinotrichum* ou même *Rhinocladiella* — nous avons, pour plus de clarté, conservé le nom générique de *Sporotrichum*. Ils sont caractérisés par un mycélium ramifié, cloisonné, à branches ordinairement égales, jamais verticillées, portant latéralement, ou à leur sommet, de nombreuses conidies ovoïdes (fig. 1). Ces champignons provoquent chez l'homme une maladie connue sous le nom de sporotrichose, se manifestant par l'apparition de nombreuses tuméfactions gommeuses pouvant siéger sur toutes les parties du corps.

La présence de *Sporotrichum* vivant en saprophyte sur des végétaux a été signalée par Gougerot et de Beurmann [9], par Sartory [14]. Emmons cite 6 cas de sporotrichose observés chez des fleuristes [7]. Du Toit [6] a montré la présence de *Sporotrichum* sur des bois de charpente. De même, des bois utilisés au boisage des mines d'or du Transvaal ont été à l'origine d'une très importante épidémie de sporotrichose (2.825 cas) [2].

Brown, Weintraub et Simpson, les auteurs qui ont étudié cette dernière épidémie, ont réussi à cultiver les *Sporotrichum* sur des échantillons divers de bois maintenus à une humidité relative

(1) Ces travaux ont été réalisés sous la direction de M. le Dr J. Magrou, Membre de l'Institut, à qui nous exprimons nos sentiments de respectueuse reconnaissance.

Que M. le Dr A. Lwoff, qui nous a fait bénéficier de ses précieux conseils, trouve ici l'expression de notre gratitude.

Nos remerciements vont également à M^{lle} M. Couteau pour l'aide qu'elle nous a apportée.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} juin 1950.

très élevée. Habituellement ces champignons sont cultivés sur les milieux complexes ordinairement employés en technique mycologique (gélose de Sabouraud, malt gélosé, etc.). Ces milieux contiennent, on le sait, des facteurs de croissance qui proviennent des impuretés des produits employés pour leur fabrication. Le maltose brut, la peptone et la gélose qui entrent, par exemple, dans la formule du milieu gélosé de Sabouraud, contiennent de nombreux facteurs stimulant la croissance des micro-organismes [15, 16].

D'après Oyama cité par Robbins [42], la croissance du *Sporotrichum beurmanni* et *Sp. schencki* est améliorée par l'addition

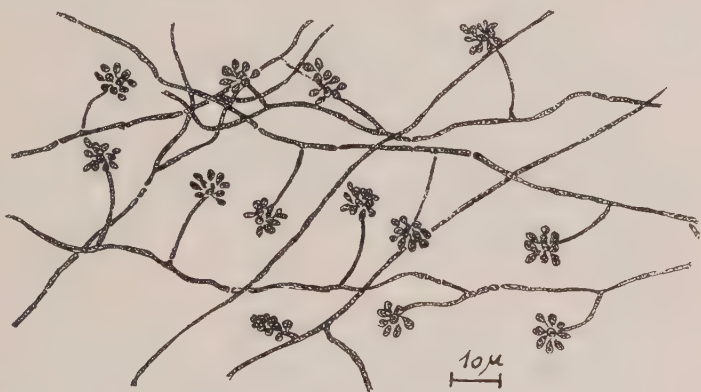


FIG. 1. — Mycélium et bouquet de conidies de *Sporotrichum schencki*.

à un milieu synthétique de polissures de riz, ou d'aneurine. L'action favorisante de cette vitamine sur *Sporotrichum schencki* est confirmée par Burkholder et Moyer [3].

Au cours d'une étude sur la perte du pouvoir de synthétiser l'aneurine et ses constituants chez un certain nombre de champignons pathogènes, nous avons pu mettre en évidence l'activité de la pyrimidine de l'aneurine comme facteur de croissance pour tout un groupe de *Sporotrichum* [5].

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

La première expérience a porté sur les souches mentionnées dans le tableau ci-après :

Par la suite, et du fait que les résultats obtenus dans la première expérience étaient identiques, pour toutes les espèces ou souches étudiées, nous avons seulement employé la souche *Schencki* 879.

TABLEAU I.

<i>Sporotrichum beurmanni</i> . . .	Provenant de l'Institut Pasteur. Sporotrichose humaine.
<i>S. schencki</i> (1) *	Souche isolée d'une sporotrichose humaine provenant du Dr N. F. Conant, Durham N. C. (U. S. A.), 1946.
<i>S. schencki</i> 879*	Souche isolée d'une sporotrichose du cheval, par le Dr K. F. Meyer, Philadelphie, 1913.
<i>S. schencki beurmanni</i> 32 * . .	Souche isolée lors d'une épidémie de sporotrichose des mines d'or du Transvaal.
<i>S. tropicale</i> *	Souche provenant du Dr Ghose, School of Tropical Medicine, Calcutta, 1917.

(1) Les souches marquées d'un astérisque nous ont été aimablement transmises par le Dr J. T. Duncan, directeur du Service de Mycologie médicale de London School of Hygiene and Tropical medicine de l'Université de Londres.

MILIEU DE CULTURE.

Le milieu de base utilisé dans nos différentes expériences est le milieu synthétique simple préconisé par Schopfer :

<i>l</i> -asparagine synthétique.	1 g.
SO ₄ Mg 7 H ₂ O	0,5 g.
PO ₄ H ₂ K	1,5 g.
Glucose	30 g.
Eau distillée dans le Pyrex	1.000 cu ³

A ce milieu sont ajoutées X gouttes d'une solution d'oligo-éléments [4]. Les métaux suivants figurent donc dans le milieu : Fe, Mn, Cu, Ni, Co, Ti, Zn, Ca, Gl, B. Le glucose employé dans la fabrication du milieu est du glucose pur R. A. L. traité par un charbon activé (« Norit A ») afin d'éliminer toute trace de vitamines adsorbables (B₁ en particulier).

Le milieu de base est réparti dans des vases de culture et on y ajoute le facteur à étudier à concentration désirée.

Les vases de culture utilisés sont, soit des tubes de verre Pyrex de 22 mm. de diamètre, soit des fioles d'Erlenmeyer en verre Pyrex également, soit encore, et c'est le modèle de récipient qui nous semble le plus favorable, les tubes dits de Legroux. La forme spéciale de ces tubes permet à 20 cm³ de milieu liquide de s'étaler en une couche horizontale de 5 mm. d'épaisseur. L'aération de la culture y est donc très satisfaisante.

Toute la verrerie utilisée est soigneusement lavée au mélange sulfo-chromique chaud puis abondamment rincée, d'abord à l'eau ordinaire, puis à l'eau distillée dans du verre Pyrex.

Le bouchage des fioles de culture est effectué avec du coton hydrophile enveloppé ou non dans un carré de gaze à pansement. Le coton employé au bouchage peut être, en effet, une source importante de facteurs de croissance variés [17, 10, 4].

Après répartition et bouchage les fioles de culture sont autoclavées une demi-heure à 115° C.

Il est bon de tenir compte des plus petits détails, afin d'éliminer, dans la mesure du possible, toute cause d'erreur. Le contrôle de la présence accidentelle de vitamine B₁ ou de ses constituants dans le milieu de base à l'aide du test *Phycomyces blackesleanus* a été, pour plus de sécurité, effectué pour chacune de nos expériences.

Les champignons étudiés sont ensemencés dans les fioles de culture à raison d'une goutte de spores lavées par centrifugation. Cette goutte contient environ 100 spores par millimètre cube.

La croissance des cultures est déterminée par pesée du mycélium.

EXPÉRIENCES.

Au milieu de base, nous avons ajouté, au cours d'une première expérience : 1° du thiazole (4-méthyl-5-hydroxyéthyl-thiazole) à la concentration 1.10^{-7} ; 2° de la pyrimidine (2-méthyl-5-bromo-méthyl-6-amino-pyrimidine) à 1.10^{-7} ; 3° du thiazole et de la pyrimidine à 1.10^{-7} chaque ; 4° de l'aneurine à 1.10^{-7} . Du milieu de base seul constituait la série témoin.

Le tableau II a été établi d'après les différents poids secs obtenus.

Pour toutes les souches étudiées, la croissance qui est pratiquement nulle dans le milieu de base seul (2), est abondante dans les milieux additionnés soit de pyrimidine seule (fig. 2), soit de pyrimidine et de thiazole, soit enfin d'aneurine.

On peut déduire de ces résultats que les *Sporotrichum* étudiés ont tous conservé le pouvoir de synthétiser le thiazole, mais qu'ils exigent de la pyrimidine pour mener à bien la synthèse de l'aneurine.

Les expériences suivantes sont réalisées avec le seul *Sporotrichum schencki* souche 879 ; elles nous ont permis d'étudier la croissance du *Sporotrichum*, tout d'abord en fonction de la concentration en pyrimidine, ensuite, pour une concentration donnée de pyrimidine, en fonction du temps.

Le milieu de base reçoit de la pyrimidine (2-méthyl-4-amino-éthyl-pyrimidine) aux concentrations suivantes : 1.10^{-9} , 5.10^{-9} , 1.10^{-8} , 5.10^{-8} , 1.10^{-7} , 5.10^{-7} , 1.10^{-6} , 5.10^{-6} , 1.10^{-5} .

Après quatorze jours d'incubation dans une étuve à 26° les

(2) Le très faible développement observé dans le milieu de base seul est dû aux facteurs de croissance en réserve dans les spores ensemencées. Ces facteurs permettent seulement la germination des spores mais ne permettent pas une croissance normale. Les choses se passent ici comme dans le cas du *Phycomyces blackesleanus* étudié par Schopfer.

cultures sont tuées par addition de formol puis on effectue le poids sec du mycélium des différentes cultures. Ce sont les poids

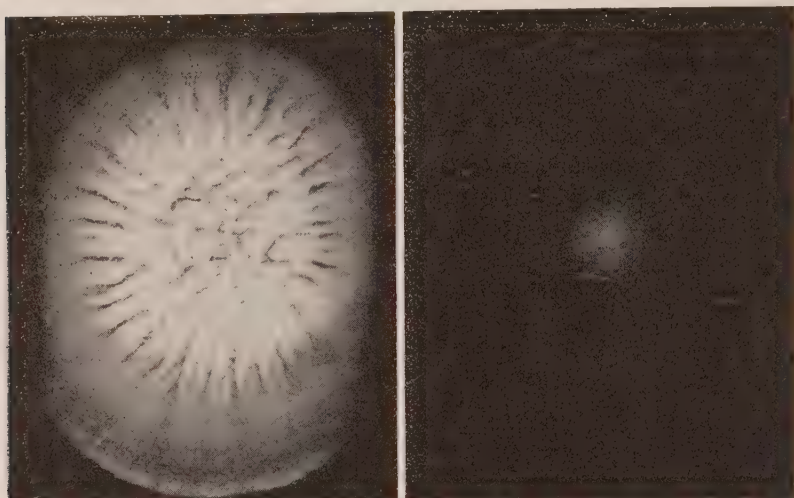


FIG. 2. — Culture de *S. schencki* souche 879, à droite, sur le milieu synthétique gélosé; à gauche, sur le même milieu additionné de pyrimidine (1.10^{-6}).

TABEAU II.

	CROISSANCE					SYNTHÈSE	
	Milieu témoin	Facteurs de croissance ajoutés				de Thiazole	de Pyrimidine
		Thiazole 1.10^{-7}	Pyrimidine 1.10^{-7}	Thiazole + Pyrimidine	Aneurino 1.10^{-7}		
<i>Sporotrichum beurmanni</i> . . .	0	0	+	+	+	+	0
<i>S. schencki</i>	0	0	+	+	+	+	0
<i>S. schencki</i> 879.	0	0	+	+	+	+	0
<i>S. schencki beurmanni</i> 32 . .	0	0	+	+	+	+	0
<i>S. tropicale</i>	0	0	+	+	+	+	0
0, croissance nulle; +, croissance abondante.						0, absence de synthèse; +, synthèse.	

secs moyens de chacune des catégories qui nous ont permis d'établir la courbe représentée à la fig. 3. Cette courbe montre

que le poids sec de mycélium augmente avec la concentration du milieu en pyrimidine et que le poids maximum est obtenu pour une concentration de 1.10^{-6} . A la concentration optimum de pyrimidine qui est de $1 \mu\text{g}$ par centimètre cube de milieu, il se forme $5.500 \mu\text{g}$ de mycélium sec par centimètre cube. En admet-

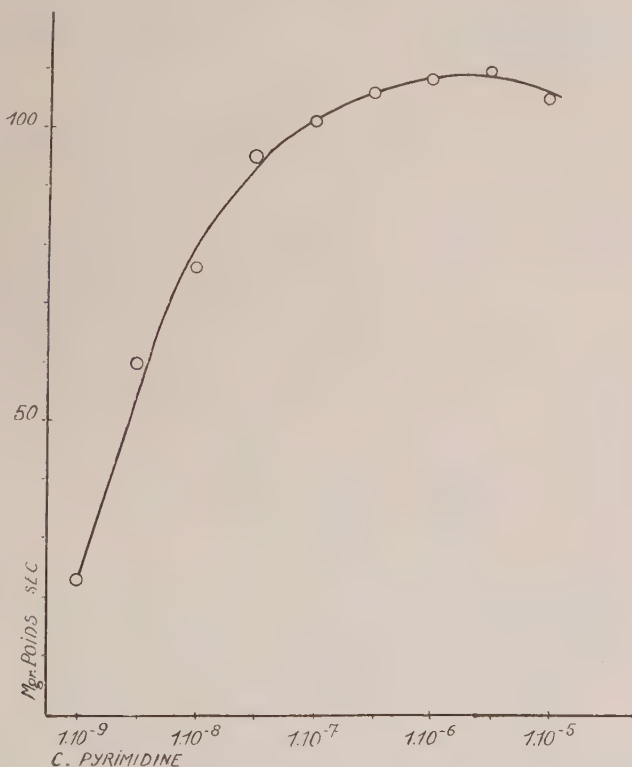


FIG. 3. — Courbe de croissance de *S. schencki* en fonction de la concentration de pyrimidine dans le milieu synthétique de base après 14 jours de culture.

tant que toute la pyrimidine soit consommée, le rapport du poids de pyrimidine sur le poids de mycélium serait de $1/5.500$.

Pour établir la courbe de la croissance du *Sporotrichum* en fonction du temps, nous avons choisi la concentration optimum de pyrimidine (1.10^{-6}) et nous avons déterminé chaque jour le poids sec de plusieurs cultures prélevées au hasard (fig. 4).

La croissance qui commence au troisième jour de la culture atteint son maximum au quatorzième jour. Après ce délai on assiste à une diminution des poids secs, probablement due à

une lyse du mycélium au cours de la sporulation du *Sporotrichum*.

Fromageot et Tchang [8] ont montré que *Rhodotorula sânniei*, champignon levuriforme pour lequel la pyrimidine est facteur de croissance en milieu glucosé, peut, dans un milieu où le glucose est remplacé par du glycérol pur, se développer et se pigmenter en l'absence de pyrimidine. Tout se passe comme si la levure était incapable de synthétiser la pyrimidine lorsque le glucose

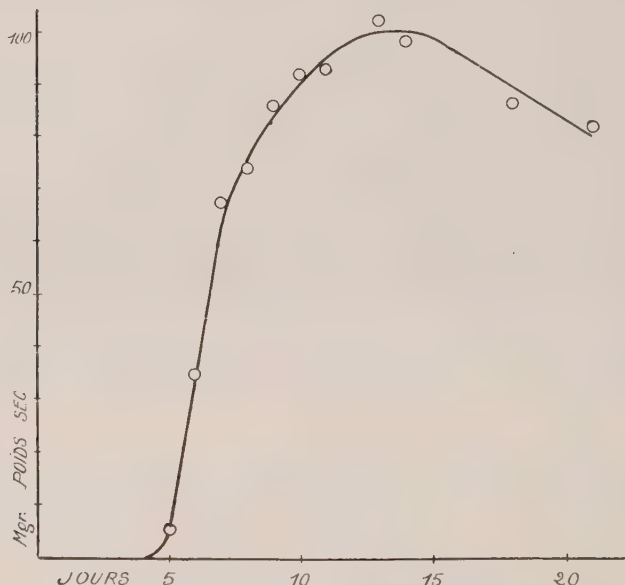


FIG. 4. — Courbe de croissance de *S. schencki* en fonction du temps dans le milieu synthétique de base additionné de 1.10^{-6} de pyrimidine.

sert d'aliment carboné et que cette synthèse soit possible lorsque la source d'énergie est représentée par le glycérol.

Nous avons essayé de cultiver comparativement le *Sporotrichum* sur le milieu de base glucosé et sur un même milieu où le glucose avait été remplacé par du glycérol pur à la concentration de 5 p. 100. Le milieu glycéroliné a été divisé en deux catégories : le glycérol de l'une était traité par du charbon activé, celui de l'autre n'était pas traité.

Pour chacune des catégories nous avons ménagé un témoin ensemencé avec *Phycomyces blackesleeanus*. Après quatorze jours de culture, les poids secs moyens de chacune des catégories de *Sporotrichum* étaient les suivants :

TABLEAU III.

	POIDS SEC en mg.	CROISSANCE du <i>Phycomyces</i>
Milieu glucosé	0,0	Croissance nulle.
Milieu au glycérol norité. . . .	0,4	Croissance nulle.
Milieu au glycérol non norité .	3,5	Très faible croissance.

Contrairement à ce qui se passe pour *Rhodotorula sannici*, le *Sporotrichum* a besoin de pyrimidine en présence de glycérol.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION.

1° La pyrimidine de l'aneurine est indispensable à la croissance de *Sporotrichum beurmanni* souche I. P., *S. schencki* (trois souches) et de *S. tropicale*.

2° La pyrimidine est le seul facteur de croissance nécessaire aux *Sporotrichum* étudiés.

3° La concentration optima de pyrimidine est de 1.10^{-6} .

4° A cette concentration 1 μg de pyrimidine permet la formation de 5.500 μg de mycélium sec.

5° Le besoin de pyrimidine se manifeste aussi bien dans un milieu au glycérol que dans un milieu au glucose.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BERTHELOT (A.), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, **16**, 1553.
- [2] BROWN (R.), WEINTROUB (D.) et SIMPSON (M. W.). In *Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand*. Transvaal Chamber of Mines, édit. Johannesburg, 1947.
- [3] BURKHOLDER (P. R.) et MOYER (D.). *Bull. Torr. Bot. Club.*, 1943, **70**, 372.
- [4] CONSTANTIN (T.). *C. R. Soc. Biol.*, Paris, 1945, **139**, 274.
- [5] DROUHET (E.) et MARIAT (F.). *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 1950, **230**, 319.
- [6] DU TOIT (C. J.). *Proceed. Transvaal Mine Med. Assoc.*, 1942, **22**, 111.
- [7] EMMONS (C. W.). *J. Am. Med. Assoc.*, 1941, **117**, 1074.
- [8] FROMAGEOT (C.) et TCHANG (J. L.). *Arch. Mikrobiol.*, 1938, **9**, 434.
- [9] GOUGEROT (H.) et de BEURMANN. *Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1908, **37**, 733.
- [10] LWOFF (A.) et DUSI (H.). *C. R. Soc. Biol.*, Paris, 1938, **127**, 53.
- [11] ORLA-JENSEN (S.) et OTTE (N. C.). *Centralbl. Bakt.*, 1936, **94**, 452.
- [12] ROBBINS (W. J.). *Am. J. Bot.*, 1939, **26**, 772.
- [13] ROBBINS (W. J.) et KAVANAGH (V.). *Bot. Rev.*, 1942, **8**, 411.
- [14] SARTORY (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1915, **72**, 740.
- [15] SCHOPFER (W. H.). *Bull. Soc. Bot. Suisse*, 1931, **40**, 87.
- [16] SCHOPFER (W. H.). *Bull. Soc. Bot. Suisse*, 1932, **41**, 73.
- [17] SCHOPFER (W. H.) et RYTZ (W. J^r). *Arch. Mikrobiol.*, 1937, **8**, 244.

ACTION DE L'ANEURINE ET DE SES CONSTITUANTS SUR QUELQUES MUCORACÉES PATHOGÈNES

par F. MARIAT et E. DROUHET (*).

(Institut Pasteur.
Service de Physiologie végétale et de Mycologie.)

Les Mucoracées sont des Phycomycètes qui se rencontrent très fréquemment dans la nature, le plus souvent sur les matières en décomposition. Les travaux fondamentaux de Schopfer sur *Phycomyces blakesleeanus* ont amené un très grand nombre de chercheurs à étudier les divers champignons de cette famille du point de vue de la synthèse de métabolites essentiels [4]. Ainsi plusieurs Mucoracées saprophytes exigent l'aneurine ou un de ses composants comme facteurs de croissance. Citons *Phycomyces blakesleeanus*, *Mucor ramannianus*, *Absidia ramosa*, *Parasitella simplex*. Par contre, d'autres espèces synthétisent cette substance : *Mucor mucedo*, *M. hiemalis*, *Absidia repens*, *A. glauca*, *A. orchidis*, *Sporodinia grandis*.

Il nous a semblé intéressant d'étudier le pouvoir de synthèse chez des Mucoracées pathogènes pour l'homme et l'animal, champignons qui provoquent des mycoses généralisées ou à localisations pulmonaire, auriculaire ou naso-pharyngée [3]. Les espèces étudiées ici sont celles qui appartiennent au genre *Lichtheimia*, genre créé par Vuillemin [5] en démembrement du genre *Mucor* et caractérisé par un mycélium ramifié, dépourvu de rhizoïdes ; les sporangiophores sont ramifiés en corymbes ou en ombelles et portent des sporanges globuleux ou piriformes avec des columelles coniques et des apophyses en entonnoir.

Les espèces utilisées sont :

Lichtheimia corymbifera Vuill. (*Mucor corymbifer* Cohn) 1884, souche 1, provenant de la collection de l'Institut Pasteur, souche 2, provenant du « Centraal Bureau voor Schimmel cultures » de Baarn.

Lichtheimia italica, Perin et Costantin, espèce isolée d'une mycose pulmonaire par Costantin et Perin en 1922 et voisine de *L. corymbifera* [4].

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} juin 1950.

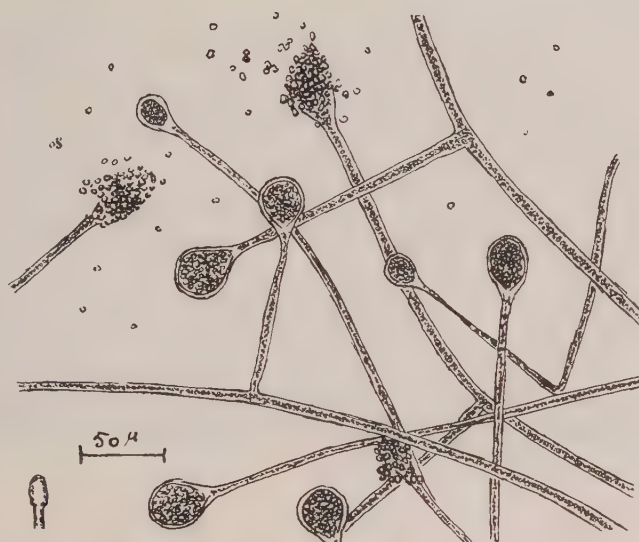


FIG. 1. — Mycélium et sporanges de *Lichtheimia corymbifera*.

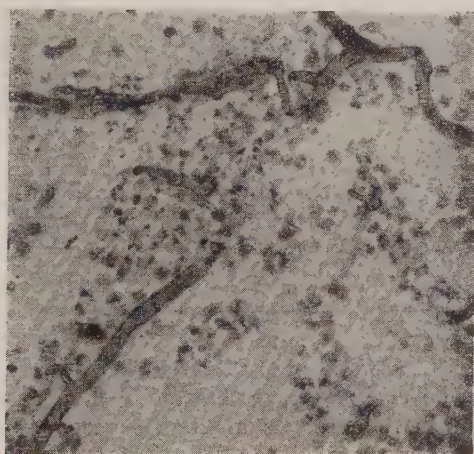


FIG. 2. — Mucormycose expérimentale.
Cerveau de lapin inoculé avec *Lichtheimia italica*.

Les cultures ont été faites sur un milieu synthétique de base contenant :

<i>L</i> -asparagine synthétique	1 g.
SO ₄ Mg 7H ₂ O	0,5 g.
PO ₄ H ₂ K	1,5 g.
Glucose traité par le charbon activé (« Norit A »)	30 g.
Eau distillée dans du verre Pyrex	1.000 g.
Fe, Mn, Cu, Ni, Co, Li, Zn, Ca, Gl, B.	

Les diverses techniques utilisées sont les mêmes que celles détaillées dans une note précédente [2].

Les 3 souches de *Lichtheimia* ont été ensemencées sur le milieu de base, seul ou additionné soit de thiazole (4-méthyl-5-hydroxy-éthyl-thiazole) à la concentration de 1.10^{-7} ; soit de pyrimidine (2-méthyl-5-bromo-méthyl-6-aminopyrimidine) 1.10^{-7} ; soit de ces deux produits à 1.10^{-7} ; soit enfin d'aneurine à 1.10^{-7} . Les poids secs du mycélium, obtenus après sept jours d'incubation à 26°, nous ont permis de dresser le tableau suivant :

TABLEAU I.

	CROISSANCE					SYNTHÈSE	
	Facteurs de croissance ajoutés					de thiazole	de pyrimidine
	Milieu témoin	Thiazole 1.10^{-7}	Pyrimidine 1.10^{-7}	Thiazole + Pyrimidine	Aneurine 1.10^{-7}		
<i>Lichtheimia italica</i>	0	0	0	+	+	0	0
<i>L. corymbifera</i> (souche C. B. S. Baarn).	0	0	0	+	+	0	0
<i>L. corymbifera</i> (souche I. Pasteur).	+	+	+	+	+	+	+
0, croissance nulle; +, croissance abondante.						0, absence de synthèse; +, synthèse.	

Les souches *L. italica* et *L. corymbifera* de Baarn exigent comme facteur de croissance, le thiazole et la pyrimidine réunis ; elles ont perdu le pouvoir de synthétiser ces deux métabolites.

La souche *L. corymbifera* de l'Institut Pasteur se développe normalement sur le milieu de base, elle est donc douée du pouvoir de synthétiser la vitamine B₁ et ses constituants. Il nous semble intéressant de signaler que, d'une part, les deux premières souches (*L. italica* et *L. corymbifera* de Baarn) sont très pathogènes pour le lapin qui succombe deux à trois jours après inoculation intraveineuse d'une suspension de spores (100.000 spores), l'animal présentant à l'autopsie un envahissement du cerveau,



FIG. 3. — Culture de *Lichtheimia italica* en milieu synthétique de base, seul (T), ou additionné de pyrimidine (Py), de thiazole (Th), de thiazole et pyrimidine (Th + Py). Le champignon ne se développe que dans le milieu additionné de thiazole et de pyrimidine (Th + Py).

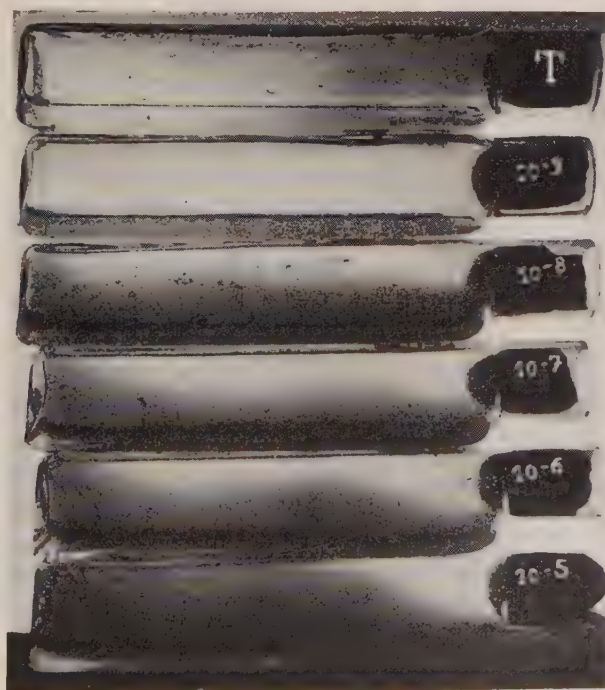


FIG. 4. — Culture de *L. italica* en milieu synthétique de base (T), additionné de doses croissantes d'aneurine (photographie après neuf jours de culture).

des poumons et des reins par des filaments mycéliens, tandis que, d'autre part, la souche *L. corymbifera* de l'Institut Pasteur n'est pas pathogène pour le lapin.

Nous n'entendons pas, pour autant, démontrer qu'il existe, dans ce cas-là, une relation entre la perte du pouvoir de synthétiser l'aneurine et le pouvoir pathogène.

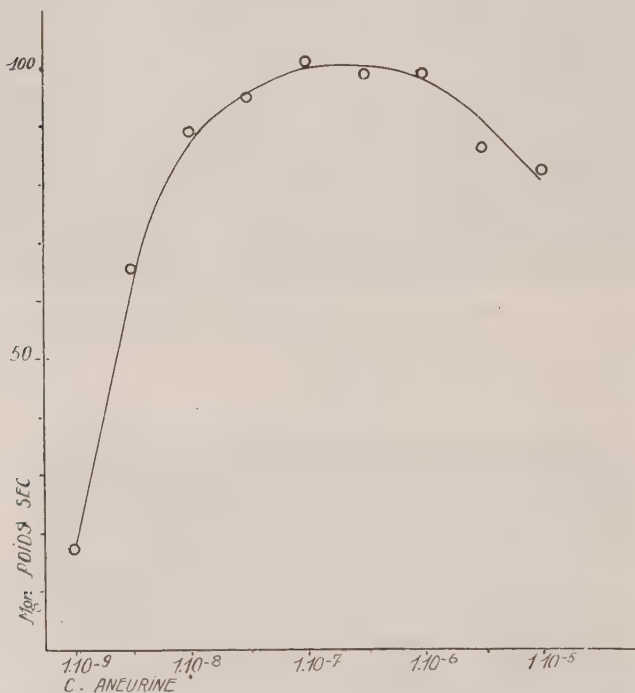


FIG. 5. — Courbe de croissance de *L. italica*, en fonction de la concentration d'aneurine dans le milieu synthétique de base (après neuf jours de culture).

L'expérience précédente montrant que l'aneurine était le facteur requis pour le développement du *L. italica*, nous avons suivi la croissance de cette souche en la cultivant dans un milieu de base additionné de doses croissantes d'aneurine. Après neuf jours de culture à 26° C., les cultures sont tuées au formol et les poids secs de mycélium déterminés. La courbe représentée à la figure 5 est le résumé des résultats obtenus. Cette courbe montre que le développement du mycélium augmente avec la dose de vitamine, jusqu'à un optimum de croissance qui correspond à la concentration 1.10^{-7} d'aneurine.

A la concentration optima d'aneurine qui est de 0,1 μg par

centimètre cube de milieu, il se forme $5.065 \mu\text{g}$ de mycélium sec par centimètre cube. En admettant que toute l'aneurine soit consommée, le rapport poids d'aneurine sur poids de mycélium sec serait de $\frac{1}{50.650}$. Avec des doses plus fortes de vitamine, le poids du mycélium décroît. Une courbe de croissance du champignon en fonction du temps, en présence d'une concentration d'aneurine 1.10^{-5} , supérieure à la dose optimum, nous a permis de montrer que la diminution de poids aux fortes concentrations

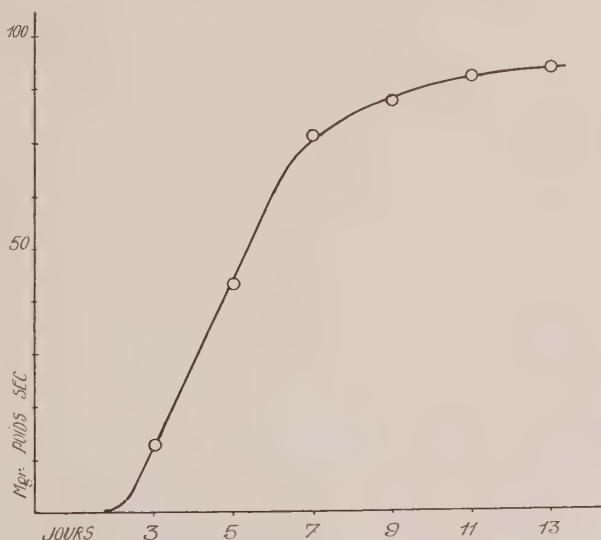


FIG. 6. — Courbe de croissance de *L. italica* en fonction du temps dans le milieu synthétique de base additionné de 1.10^{-5} d'aneurine.

n'était pas due à une lyse du mycélium au moment de la sporulation, mais plutôt à une action inhibante (fig. 6).

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° L'aneurine, ou le thiazole et la pyrimidine réunis, sont indispensables à la croissance de *Lichtheimia italica* et *L. corymbifera*. souche du C. B. S. Baarn.

2° L'aneurine ou le thiazole et la pyrimidine réunis sont les seuls facteurs nécessaires pour les deux souches mentionnées ci-dessus.

3° La concentration optima d'aneurine est de 1.10^{-7} .

4° A cette concentration, $1 \mu\text{g}$ d'aneurine permet la formation de $50.650 \mu\text{g}$ de mycélium sec.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] COSTANTIN (J.) et PERIN (A.). *Boll. Soc. Med. Chir. Pavia*, 1922, **35**, 1.
- [2] DROUHET (E.) et MARIAT (F.). *Ces Annales*, 1950, **79**, 306.
- [3] LÉPINE (P.), MAGROC (J.) et SAUTTER (M^{lle} J.). *Ces Annales*, 1939, **62**, 510.
- [4] SCHOPFER (W. H.). *Plants and Vitamins*. Chronica Botanica. Wal-
tham, édit., 1943.
- [5] VUILLEMIN (P.). *Arch. Parasit.*, 1904, **8**, 562.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 6 Juillet 1950.

Présidence de M. MAGROU.

PRÉSENTATION D'OUVRAGE

M. Lépine : J'ai l'honneur d'offrir à la Société au nom du D^r G. M. Findlay, la récente troisième édition de son ouvrage remanié *Recent Advances in Chemotherapy* (1).

Le présent volume est le premier des quatre que comprendra l'ouvrage complet. Il nous donne après un excellent historique de la chimiothérapie, trois chapitres sur la chimiothérapie des maladies dues aux insectes, aux helminthes et aux amibes, ce dernier comprenant à lui seul 142 pages. Le cinquième chapitre traite de la chimiothérapie des protozoaires autres que les principaux (babésies, coccidies, giardies, etc.). Les deux derniers chapitres sont consacrés à la chimiothérapie des leishmanioses et à celle des trypanosomiasés. Des tables très complètes des sujets, des noms d'auteurs et des composés chimiques, facilitent les recherches.

Il serait injuste de limiter la présentation de l'ouvrage à cette simple énumération de son contenu ; Findlay a réussi le tour de force de présenter en 625 pages un condensé de la chimiothérapie d'une bonne partie des infections à protozoaires et parasitaires. Les volumes qui suivent comprendront, l'un la chimiothérapie du paludisme, l'autre celle des tréponématoses et enfin les infections bactériennes et les rickettsioses. L'ensemble formera un véritable traité complet, car c'est bien de cela qu'il s'agit, le petit format et la maniabilité de l'ouvrage ne devant point faire illusion.

Chaque sujet est traité de façon extensive, chaque chapitre se termine par une abondante bibliographie. Sans longueurs ni digressions oiseuses, toutes les publications sont rapportées, même celles qui ont abouti à des résultats négatifs, ce qui évitera aux auteurs ou aux médecins des essais inutiles. La formule chimique développée de presque tous les corps est donnée avec des notions suffisantes de leurs constantes phy-

(1) G. M. FINDLAY, *Recent Advances in Chemotherapy*, J. et A. Churchill Ltd. 104 Gloucester Place, London W. 1, 1950, vol. 1, 625 pages, 21 x 14,5 cm. Prix : 36 S.

siques et de leur toxicité. De nombreux tableaux résument les résultats obtenus avec des familles de corps ou les dérivés d'un produit efficace. La présentation est claire, les références précises et complètes.

On ne peut que féliciter sans réserve l'auteur pour la somme considérable de travail que représente son ouvrage et le résultat qu'il en a tiré. Nous attendons avec impatience les tomes qui compléteront le présent volume et feront de l'ensemble un des livres les plus consultés dans une branche de la recherche où abondent les travaux et où les progrès sont rapides.

COMMUNICATIONS

SUR LA PLACE DES VIRUS ET SA REPRÉSENTATION DANS L'ÉCHELLE DES ÊTRES ORGANISÉS

par PIERRE LÉPINE et TAGE STRUNGE.

Le problème des virus [1] présente des aspects multiples qui vont des questions purement techniques aux débats de philosophie métaphysique.

Quelle que soit la position adoptée, et quel que soit l'angle sous lequel la question est abordée, il doit être tenu compte de l'importance relative des virus, pris dans leur ensemble, par rapport aux autres structures organisées avec lesquelles ils se trouvent en relation et à côté desquelles on est amené à les classer.

Sans préjuger de la nature intime des virus, sur laquelle porte l'essentiel de la discussion, une tendance naturelle consiste à envisager ces derniers en tant qu'organismes [2] et à les intégrer à ce titre dans l'échelle des organismes doués d'autonomie spécifique, capables de reproduction, que constitue l'échelle des êtres vivants. Si l'on veut voir, dans certains d'entre les virus, des espèces macromoléculaires, le problème de leur position par rapport aux êtres vivants n'en subsiste pas moins.

C'est dans cet esprit que la phrase classique « des plus grosses des molécules aux plus petites des bactéries » sert couramment à assigner aux virus une place légitime dans l'ordre de grandeur de taille des organismes considérés.

Si l'on cherche à matérialiser ce concept, la représentation en est faite graphiquement en figurant sur un tableau des cercles ou des silhouettes proportionnelles aux diamètres moyens des organismes [3], en prenant pour étalon la taille d'une bactérie ou d'une hématie.

Plus simplement encore, on peut représenter les tailles envisagées comme des segments d'un vecteur le long duquel s'échelonnent les diverses catégories d'organismes, en donnant à chaque segment une longueur arithmétiquement proportionnelle à la taille, exprimée par le diamètre moyen, du sujet représenté. On peut ainsi faire figurer sur une seule ligne tout le monde vivant.

Ce dernier mode de représentation, si l'on y fait entrer l'ensemble

des êtres, affecte aux virus une place infime à une extrémité de l'échelle dont la presque totalité est occupée par les êtres les plus élevés en organisation : ce qui répond certainement à notre sentiment anthropocentrique de l'univers, mais qui donne de l'importance des organismes moins élevés en organisation une idée absolument fausse.

Si nous considérons, en effet, au cours de son développement individuel, la croissance de l'un quelconque des organismes figurant sur le tableau, la notion que cet accroissement de taille se fait dans les trois dimensions de l'espace, rend évidente le fait que la croissance réelle est grossièrement proportionnelle non au diamètre linéaire de l'organisme mais au cube de ce diamètre.

Nous pouvons donner du phénomène une représentation graphique satisfaisante sur un tracé linéaire en y faisant figurer non plus les diamètres de l'organisme mais le logarithme des volumes occupés, traduction dans un espace à une dimension d'un accroissement tridimensionnel, fonction du mode de reproduction.

La comparaison des deux modes de représentation, arithmétique et

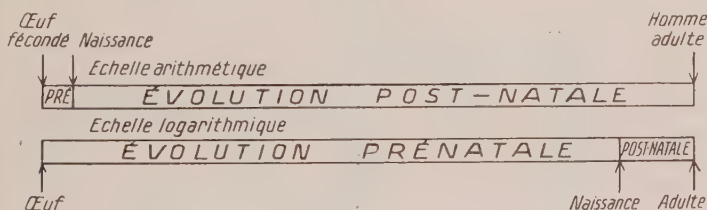


FIG. 1. — Représentation selon l'échelle arithmétique (tracé supérieur) et selon l'échelle logarithmique (tracé inférieur) de la croissance de l'homme.

logarithmique, appliquée par exemple au tracé linéaire de la croissance de l'homme (fig. 1) montre immédiatement que le tracé logarithmique met en évidence toute l'importance de la période de croissance intra-utérine, où s'élabore l'organisme et où se fait toute la différenciation, par rapport à la période extra-utérine qui n'est en réalité que la fin de son évolution.

Si nous appliquons la même méthode de représentation à l'échelle de taille des êtres vivants (fig. 2) en y faisant figurer les virus, on constate que ces derniers, considérés en tant qu'intermédiaires entre le monde organique inanimé et le monde vivant, occupent une place infiniment plus grande que ne le laisse supposer la simple échelle arithmétique des tailles.

Dans le spectre des êtres, les bactéries n'occupent plus qu'une bande restreinte correspondant aux limites de leur évolution. Les virus, au contraire, remplissent et dépassent en chevauchant chaque extrémité le large intervalle qui s'étend entre les molécules et les bactéries : fait qui aide à comprendre le caractère disparate et la variété étendue de propriétés comme de structure qu'offrent les ultravirus. Les rickettsies constituent un pont étroit entre ces derniers et les bactéries, ce qui répond effectivement à leur position systématique.

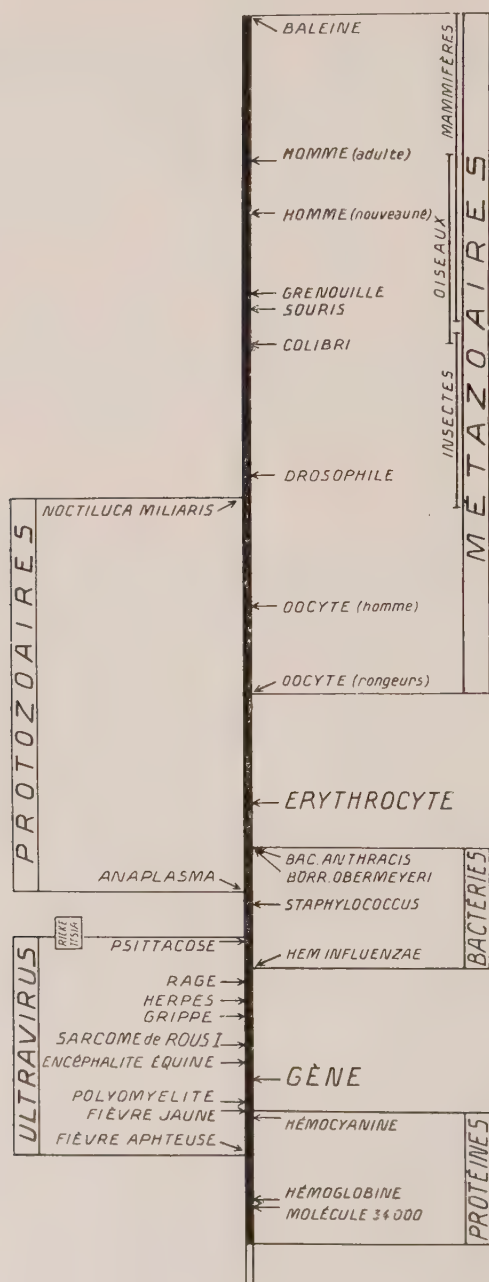


FIG. 2. — Echelle de tailles des êtres organisés classés selon le logarithme des volumes.

Il nous semble que la schématisation des relations spatiales des virus au moyen de l'échelle logarithmique donne mieux qu'une simple représentation graphique des tailles. Elle introduit dans le chaos des structures organisées, et en particulier des êtres vivants, une perspective qui place les différents sujets à leur plan respectif d'importance, et qui souligne, dans le cas des virus, l'intérêt ontogénique de leur situation, l'étendue de leur domaine, comme le nombre et le caractère évolutif des différentes espèces qu'ils comprennent.

(Institut Pasteur.)

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. LÉPINE, *Virus Research and the Virus Problem*, London University Lecture, 1949.
- [2] F. M. BURNET, *Virus as organism*, Harvard University Press, 1945.
- [3] W. M. STANLEY, *Chemical and Engineering News*, 1947, **25**, 3786-3791.

STRUCTURE ALVÉOLAIRE DES SPHEROPHORACEÆ, MISE EN ÉVIDENCE SUR LAME PAR LES SOLVANTS DES LIPIDES

par A.-R. PRÉVOT, P. TARDIEUX et M. RAYNAUD.

En étudiant la morphologie remarquablement variable de *Spherophorus ridiculosus* P. 1949 (1) nous avons été amenés à instaurer une technique très simple et très rapide mettant en évidence sa structure alvéolaire.

Technique. — On étale sur une lame très propre 1 goutte de culture de vingt-quatre heures, on sèche et on fixe par l'alcool absolu. Puis on traite pendant cinq minutes par un solvant des lipides tel que le xylène ou le toluène, en changeant plusieurs fois le solvant utilisé. On sèche et on colore par le Ziehl dilué ou n'importe quel autre colorant n'empâtant pas le cytoplasme.

Résultats. — On remarque au microscope une magnifique structure alvéolaire, aussi variable que la morphologie elle-même du microbe : alvéoles rondes ou ovoïdes mesurant de $0,3 \mu$ à $1,5 \mu$ de diamètre uniques, ou multiples, diversement réparties et jamais de façon régulière. Certaines formes en possèdent jusqu'à une cinquantaine dont plusieurs peuvent être confluentes (fig. 1 et 2).

Interprétation. — Ayant tout d'abord supposé que ces alvéoles étaient le lieu de concentration de l'antigène lipido-glucidique des *Spherophoraceae*, mis en évidence pour la première fois en 1938 (2), nous avons appliqué cette technique aux souches de *Spherophorus* de notre collection. Toutes nous ont donné des images semblables montrant la généralité de la structure alvéolaire de ces bactéries.

(1) A.-R. PRÉVOT, ces *Annales*, 1948, **75**, 387.

(2) A.-R. PRÉVOT et E. KIRCHHEINER, *C. R. Acad. Sci.*, 1939, **209**, 182.

Généralisant cette technique à de multiples bactéries Gram-négatives (*E. coli*, *Kl. pneumoniae*, *F. fusiformis*, *R. insolita*, *R. pseudo-insolita*, etc.) nous avons constaté leur structure alvéolaire, très prononcée chez certaines (*E. coli* où elle est beaucoup plus régulière), peu

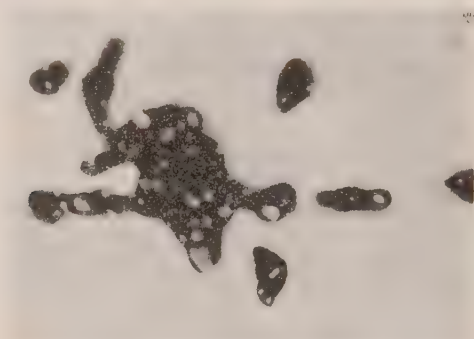


FIG. 1. — *Spherophorus ridiculosus* (Gross. : $\times 1.200.$)



FIG. 2. — *Spherophorus ridiculosus*. (Gross. : $\times 1.200.$)

accentuée chez d'autres (*Kl. pneumoniae*). Les images obtenues chez ces bactéries ressemblent en tout point aux dessins publiés par B. Delaporte (3) après coloration des globules lipidiques par le Soudan III, le noir Soudan et le mélange Nadi. Il devenait donc néces-

(3) B. DELAPORTE, *Thèse de Paris*, 1939, p. 112 et pl. VII, 2^e ligne.

saire de discerner si ces alvéoles contenaient des lipides ou des complexes lipido-glucidiques.

Ayant soumis à la même technique des bactéries Gram-positives, nous avons constaté qu'elle est incapable de mettre en évidence une structure alvéolaire chez ces bactéries, ce qui semblait nous confirmer dans l'hypothèse qu'il s'agissait bien d'alvéoles contenant l'antigène lipido-glucidique, puisqu'on ne rencontre celui-ci que chez les bactéries Gram-négatives.

Expérimentation. — Dans une première série d'expériences, nous avons traité le culot de centrifugation lavé de 4 litres de culture de *Spherophorus funduliformis* souche CH1 par le xylène. Nous avons séparé par décantation le culot du liquide surnageant.

a) Après élimination du solvant par le vide à 50°, nous avons repris le résidu par l'eau distillée et l'avons soumis aux épreuves de floculation par le sérum anti-*funduliformis* qui contient l'anticorps homologue de l'antigène lipido-glucidique. Aucune floculation ne se produisit.

b) La contre-épreuve consista à traiter le culot délipidé par l'acide trichloracétique suivant la technique de Boivin et Mesrobian, à dialyser la liqueur, à la précipiter par l'acétone, à reprendre le précipité par l'eau physiologique et à soumettre la solution aux mêmes épreuves de floculation. Ici nous avons obtenu une opalescence légère faisant penser que l'antigène lipido-glucidique n'a pas été dissous par les solvants des lipides et, au contraire, qu'il a été extrait par la technique habituelle.

Dans une deuxième série d'expériences nous avons utilisé *Eberthella typhosa*, souche O 901, bien connue pour sa richesse en antigène lipido-glucidique contre lequel nous disposons d'un sérum anti-O très actif. Dix boîtes de Roux de dix-huit heures ont été récoltées par de l'eau physiologique froide et la suspension centrifugée. Le culot a été divisé en deux parts : l'une a été traitée par 3 lavages à l'acétone à froid (—15°) et les microbes ainsi traités ont été desséchés, soumis à un broyage au mortier en présence de xylène refroidi à —15° avec contact de quatre jours.

L'extrait xylénique supposé a été évaporé dans le vide à 50°. Le résidu très peu important a été repris par l'eau distillée : il ne donne aucun précipité avec le sérum.

La portion 2 a été mélangée directement avec 20 cm³ de xylène. Après contact prolongé, 5 cm³ de cette suspension ont été agités avec 5 cm³ d'eau distillée et laissés vingt-quatre heures en contact, puis décantés. Le liquide recueilli est parfaitement limpide. En présence de sérum anti-O 901 il n'y a formation d'aucun précipité après quatre heures à 50°.

Le xylène évaporé sous vide à 50° laisse un résidu insignifiant qui, repris dans l'eau distillée, ne donne pas de précipité avec le sérum anti-O 901.

La contre-épreuve a consisté à traiter les culots préalablement soumis au xylène, par la méthode habituelle à l'acide trichloracétique. Ici l'extrait recueilli a donné avec le sérum anti-O 901 une floculation très nette.

Ainsi le xylène est incapable de dissoudre l'antigène lipido-gluci-

dique des bactéries Gram-négatives et celui-ci se retrouve dans les corps microbiens d'où on peut l'extraire par la méthode de Boivin

CONCLUSIONS. — Les substances extraites sur lame par le xylène ou le toluène, aussi bien chez les *Spherophoraceae* que chez les Eubactériales Gram-négatives, sont des lipides bactériens contenus dans des alvéoles sphériques ou ovoïdes, irrégulières dans leurs dimensions et dans leur situation et particulièrement abondantes dans le genre *Spherophorus* où certaines formes peuvent en présenter une cinquantaine. Ces lipides sont indépendants des complexes lipido-glucidiques constituant l'antigène de Boivin.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

ÉTUDE D'UNE NOUVELLE ESPÈCE ANAÉROBIE TELLURIQUE AMYLOLYTIQUE *CLOSTRIDIUM AMYLOLYTICUM* n. sp.

par A.-R. PRÉVOT et R. SAISSAC.

Au cours de recherches sur les groupements anaérobies zymogènes du sol réalisées par une technique nouvelle que nous avons mise au point avec J. Pochon et dont la description paraîtra ultérieurement, nous avons isolé une nouvelle espèce anaérobie amylolytique dont voici la description :

Lieu de prélèvement. — Terre arable de jardin à Verrières-le-Buisson, lieu dit « Les Justices », à flanc de coteau de la hauteur des Gâtines.

Mode d'isolement. — Colonne de terre amidonnée saturée d'eau. Le repiquage sur bouillie de pomme de terre d'une plage d'amyolyse détectée sur la bande de pain azyme collée sur la paroi du tube fournit une première culture d'enrichissement. Le passage sur gélose haricot profonde, puis sur gélose pomme de terre profonde, fournit des colonies bien isolées qui donnèrent une lignée pure.

Morphologie. — Il s'agit d'un *Clostridium* typique, très richement sporulé, activement mobile, fortement Gram-positif, à granulose iodophile violette. Longueur, 4 à 5 μ sur 0,8 à 1 μ . Spore ovale subterminale à double contour très large (2 μ). Dans les préparations de culture jeune sur bouillie de pomme de terre, on voit un tropisme très marqué des germes pour les grains d'amidon sur lesquels ils se collent en les ceinturant d'une gaine de corps bactériens (fig. 1). Les formes non sporulées présentent souvent des espaces clairs, non colorables, intercalés régulièrement entre des plages fortement colorées. Les deux extrémités de ces formes à espaces clairs sont toujours très colorées.

Physiologie. — Anaérobie strict, croissant déjà à 22°, avec optimum de 33° à 37°. Thermo-résistance faible (une minute à 100°). Réducteur modéré : rouge neutre, safranine et phénosafranine réduits temporairement.

Cultures. — Très gazogènes, mais non fétides : odeur butyrique très prononcée. Au début, absence totale de culture sur les milieux habituels à base de viande ou de peptone : gélose VF profonde, bouillon VF glucosé ou non, eau peptonée. Le microbe ne pousse que sur les milieux amylicés à l'exclusion de tous autres.

Gélose-haricot profonde. — Petites colonies ouatées, irrégulières, blanches, opaques. Gaz.

Gélose-pomme de terre profonde. — Même aspect. Gaz.

Bouillie de pomme de terre. — Culture rapide, abondante, très gazeuse, acidifiante (pH 4,5 après quatre jours d'étuve). Odeur buty-

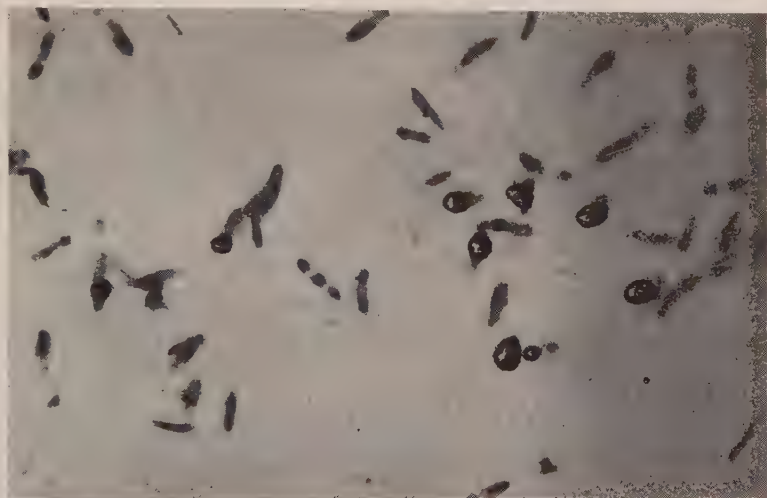


FIG. 1. — *Cl. amylolyticum* (Gross. : $\times 1.400$.)

rique très prononcée. La bouillie est désagrégée, liquéfiée, filante.

Bouillon VF glucosé ou non. — Pas de culture.

Eau peptonée à 2 p. 100. — Pas de culture quand le milieu a été autoclavé. L'absence de culture de certains microbes du sol en eau peptonée autoclavée est un fait bien connu qui a été rapporté par divers auteurs et attribué à l'action inhibitrice de l'acide oléique. Comme l'eau peptonée est essentielle comme milieu de base pour l'étude de la fermentation des glucides, nous avons, sur le conseil de J. Pochon, éliminé la ou les substances inhibitrices, soit par dilution, soit par filtration. Par dilution, quand on se maintient autour du taux de 2 p. 1.000 de peptone, on a déjà une culture faible au début, qui devient de plus en plus forte avec les repiquages. Par filtration, on obtient d'emblée sur eau peptonée à 20 p. 1.000 une culture abondante.

Ainsi la substance inhibitrice de la peptone peut être éliminée par filtration ou rendue inactive par dilution.

Gélatine. — Non liquéfiée.

Lait. — Coagulé massivement sans rétraction du caillot ni digestion ultérieure.

Protéines coagulées. — Non attaquées.

Glucides. — Spontanément, seuls l'amidon et le lactose sont fermentés par ce microbe. L'amidon d'une bouillie de pomme de terre est rapidement attaqué en anaérobiose stricte avec production de gaz et d'acides. Le lactose du lait est rapidement détruit en donnant un pH très acide.

La pectine n'est attaquée dans aucune condition.

Les glucides suivants, ajoutés à l'eau peptonée diluée et stérilisée par filtration, sont également fermentés : glucose, lévulose, galactose, maltose, saccharose, mannitol. Par la méthode de Somogyi, nous avons vu que la quantité de glucose détruite était de 15 p. 100.

Propriétés biochimiques. — Les nitrates sont progressivement réduits en nitrites en présence d'amidon seulement. En quarante-huit heures, la réaction de Tromsdorff est faible, mais elle s'amplifie rapidement et devient très forte le troisième ou quatrième jour.

Les sulfites ne sont réduits qu'en présence d'amidon et cela très lentement (huit à dix jours). La fermentation de la bouillie de pomme de terre donne en peu de temps une forte acidité composée d'une acidité volatile (1,4025 g par litre) constituée par un mélange à parties égales d'acide acétique et butyrique (1) et une acidité fixe constituée par l'acide lactique. La quantité d'ammoniac produite est très faible : 0,01 g par litre. Pas d'SH₂, ni d'acétoïne, ni d'indol ; par contre, on peut doser une quantité très forte d'acétone et d'alcools butylique et éthylique.

Pouvoir pathogène. — Cet anaérobie est totalement dépourvu de pouvoir pathogène (cobaye, souris) ; il ne sécrète ni toxine, ni hémolyse.

Position dans la systématique. — Etant donné la confusion très grande qui règne dans la taxonomie des espèces du sous-genre *Clostridium butyricum* (2), il est toujours très difficile de déterminer un germe qui, par l'ensemble de ses caractères, appartient, comme le nôtre, à ce sous-genre. Il se distingue facilement et d'emblée de toutes les espèces qui croissent sur milieux ordinaires. Par contre, il semble très voisin de 3 *Clostridium* butyriques : *Cl. aceto-butylicum* (Weizman) Mac Coy, Fred, Peterson et Hastings ; *Cl. butyricum* var. *amylozyme* Perdrix et *Cl. amylobacter* A. M. et Bredemann.

Il se distingue de *Cl. acetobutylicum* en ce que celui-ci hydrolyse le lait après coagulation, liquéfie la gélatine, donne des colonies lenticulaires, donne une écume jaunâtre et crémeuse sur bouillie de pomme de terre, produit de l'acétoïne, ne réduit pas les nitrates ni les sulfites. Il se distingue de *Cl. amylobacter* en ce que celui-ci donne des colonies lenticulaires, produit les alcools isopropanol et propanol (en plus du couple éthanol-butanol), présente des microïdies en culture et ne réduit pas les nitrates.

Le diagnostic, avec la variété *amylozyme*, est plus délicat puisque

(1) Ces déterminations ont été faites par G. N. Cohen, que nous remercions très vivement.

(2) Prévot, *Manuel de Classification des Anaérobies*, 2^e édition, 1948.

celle-ci n'a été que sommairement décrite par Perdrix. Mais elle a un caractère biochimique d'une importance considérable qui permet de la distinguer nettement de notre microbe : elle produit, en plus du couple éthanol-butanol, de l'alcool amylique. Ainsi nous pensons qu'il s'agit bien d'une espèce nouvelle, détectable seulement par la nouvelle technique de la colonne de terre amidonnée et pour laquelle nous proposons le nom de *Cl. amylolyticum*.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

CULTURE DES BACTÉRIES ANAÉROBIES A L'AIR LIBRE EN MILIEU VF.S. PAPAÏNIQUE EMPLOI DU MILIEU VF.S. PAPAÏNIQUE POUR L'ISOLEMENT RAPIDE DES ANAÉROBIES

par J. BRISOU.

Nous avons donné avec R. Babin (1) la formule d'un milieu obtenu par digestion de viande de bœuf et de foie de veau auquel nous ajoutons 0,5 g par litre de succinate de soude. Ce bouillon s'est montré particulièrement favorable à la culture à l'air libre, sans aucun autre artifice, de *W. perfringens*, *Cl. œdematiens* (var. *novyi*), de *Cl. sporogenes*, *Cl. septicum* et de *Pl. tetani*. Ces germes cultivent en quelques heures en donnant tous leurs caractères classiques. Leur pouvoir pathogène pour la souris est parfaitement conservé. Nous avons vérifié que *W. perfringens* y sécrétait son hémolysine. Nous avons poursuivi l'étude des possibilités de ce milieu en nous adressant à des souches plus exigeantes : *Spherophorus ridiculosus*, *Spherophorus necrophorus*, *Streptococcus putridus*, *Fusiformis polymorphus* se sont parfaitement accommodés de ce bouillon.

Les essais de culture de *Veillonella vulvovaginitis* et de *Staphylococcus activus* sont restés infructueux (2).

Dans ce milieu, les produits de digestion papaïnique de la viande et du foie semblent les éléments indispensables. Pour certains germes (*Clostridium*) le succinate n'est pas toujours indispensable ; en sa présence cependant les résultats sont plus réguliers et le rendement meilleur.

Pour les espèces exigeantes, il est préférable de régénérer le milieu avant son emploi. Pour les autres, comme les *Clostridium*, cette précaution ne devient indispensable que si la préparation du bouillon remonte à plus de dix jours.

Ainsi donc, le milieu VF S. papaïnique montre des qualités cer-

(1) J. BRISOU et R. BABIN, *C. R. Soc. Biol.*, 1950 (sous presse).

(2) Les souches nous ont été très aimablement adressées par M. le Dr A.-R. PRÉVOT, de l'Institut Pasteur de Paris. Nous lui exprimons notre gratitude.

taines pour la culture à l'air libre d'un certain nombre de bactéries anaérobies.

Le milieu VF S. papaïnique (1) et (3) nous a permis à deux reprises l'isolement de souches de *Welchia perfringens* en partant de selles normales.

Une émulsion de selles en eau salée physiologique est chauffée à 100° pendant quarante-cinq à cinquante secondes. On ensemence aussitôt 1 goutte de cette émulsion chauffée dans 150 cm³ de bouillon VF S. papaïnique. On reprend 1 cm³ de ce bouillon ensemencé que l'on porte dans un deuxième tube de milieu. Après quelques heures d'étuve à 37° on obtient une culture pure d'un gros bacille Gram positif, immobile, tuant rapidement la souris d'un cedème gélatineux.

Le germe étudié avait chaque fois les caractères cultureux de *Welchia perfringens*.

Ces faits montrent la possibilité d'isoler rapidement certains anaérobies du milieu extérieur par un simple ensemencement en bouillon VF S. sans aucun autre artifice.

(Ecole de Santé navale et coloniale, Bordeaux.) *

LIBÉRATION DE L'ANTIGÈNE GLUCIDO-LIPIDIQUE DE *SALMONELLA ENTERITIDIS* var. **DANYSZ** PAR LA LYSÉ BACTÉRIOPHAGIQUE

par R. WAHL et A. TERRADE.

Il était vraisemblable que la lyse par le bactériophage libérait certains composants bactériens solubles.

Nous avons constaté que c'est bien probablement le cas pour l'antigène glucido-lipidique de Boivin.

Les expériences ont été faites avec *Salmonella enteritidis*, var. Danysz lysée par le phage D4.

La purification des lysats en deux temps : adsorption sur phosphate de calcium (R. Wahl, P. Grabar, M. Rouyer et L. Blum-Emerique [4], suivie de précipitation par l'alcool à basse température (R. Wahl et L. Blum-Emerique) [5], nous a permis d'extraire et de concentrer l'antigène, qui est, comme l'on sait, précipitable par l'alcool. L'antigène glucido-lipidique de *Salmonella enteritidis* est une endotoxine [1, 2, 3] et nous avons utilisé sa toxicité sur la souris pour le mettre en évidence.

TECHNIQUE. — On a utilisé les souches X et O de *Salmonella enteritidis* var. Danysz. Leur description sera donnée dans une publication ultérieure, ainsi que celle du phage [7].

(3) J. BRISOU, ces Annales, 1950 (sous presse).

Un milieu de culture semi-synthétique a été utilisé pour préparer les lysats, suivant la technique décrite dans une autre publication [6].

La méthode de purification a été légèrement modifiée pour être adaptée au phage D4.

En effet, l'adsorption du phage D4 sur les phosphates commence à pH 6,3 environ, alors que celle de C16, utilisé dans les publications citées, ne commence qu'à pH 5,7.

Pour adsorber, dans le premier temps, les impuretés en laissant tous les phages en solution, il fallait donc opérer à un pH plus élevé que pour C16. C'est pourquoi le lysat a été, après centrifugation, alcalinisé à pH 8 avec du carbonate de sodium, et la précipitation par le phosphate de calcium arrêtée à pH 6,9.

Le volume d'éthanol utilisé pour la précipitation du lysat ayant subi la première purification était tantôt égal au volume initial, tantôt double de celui-ci. Le précipité obtenu a été redissous dans un volume dix fois moindre que le volume initial et injecté par voie intrapéritonéale à des souris blanches du poids moyen de 18 g.

1° Trois souris ont reçu 1 cm³ et trois autres 0,5 cm³ du lysat ainsi concentré dix fois. Dans chaque lot de 3, une souris a reçu en même temps 200 millions de bactéries.

Toutes les souris sont mortes en quinze minutes, après avoir présenté une agitation intense, des convulsions, des contractures et une paralysie des membres.

2° On a pratiqué des dilutions dans l'eau physiologique du lysat concentré. 1 cm³ de chaque dilution a été inoculé à deux souris. Celles qui ont reçu les dilutions aux 3/10, 4/10 et 5/10 sont mortes dans les mêmes délais et avec les mêmes symptômes que celles qui ont été inoculées avec le produit non dilué. Chez celles qui ont reçu la dilution au 2/10, les symptômes ont apparu progressivement et la mort s'est produite au bout de deux heures. L'injection du produit dilué au 1/10 ne donne aucun symptôme.

Par ailleurs, nous avons centrifugé une culture de dix-huit heures de la même souche bactérienne. Le surnageant a été traité exactement comme le lysat, par adsorption sur phosphate de calcium, précipitation par l'éthanol et reprise du précipité par un volume dix fois moindre de tampon de phosphates. Deux souris ont reçu 1 cm³ et deux autres 0,5 cm³ du produit final. Elles n'ont présenté aucun trouble.

Le produit toxique a donc bien été libéré par la lyse des bactéries, et ne peut être que l'endotoxine de Boivin.

Par ailleurs, nous avons constaté que certaines souches de *Salmonella enteritidis* var. Danysz ne donnent pas, avec le même phage D4, de lysats toxiques pour la souris. Par exemple, un lysat préparé avec la souche O, purifié et concentré vingt fois par la même méthode, s'est montré inoffensif pour la souris, même à la dose de 2 cm³. La souche O est pourtant pathogène pour la souris. Ceci confirme ce qu'on sait sur la variabilité de la production de l'antigène de Boivin par différentes souches.

Nous avons également traité par notre méthode des lysats obtenus par l'action du même phage sur d'autres espèces de *Salmonelles*. Le phage D4 était actif, en effet, sur plusieurs espèces, seulement d'ailleurs sur les variétés S.

En particulier, avec *Salmonella typhi*, nous avons obtenu des lysats

non toxiques pour la souris. Ceci n'est pas pour surprendre, étant donné le faible pouvoir pathogène de cette bactérie pour cet animal.

Enfin, nous avons constaté qu'en utilisant une autre méthode de purification (double adsorption sur phosphate de calcium [6]) on obtient avec la souche X un produit non toxique et très riche en phage. Cette méthode permet donc d'éliminer l'endotoxine.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS. — 1° Les lysats bactériophagiques de certaines souches de *Salmonella enteritidis*, var. Danysz, partiellement purifiés et concentrés dix fois par la méthode que nous avons décrite provoquent une intoxication très rapidement mortelle, dont l'antigène de Boivin paraît bien responsable.

2° Chez d'autres souches pathogènes de la var. Danysz, aucun produit toxique n'a pu être mis en évidence. La teneur en endotoxine est donc très variable suivant les souches.

3° Dans les lysats non traités, la concentration de l'antigène est insuffisante pour provoquer une intoxication.

Les produits purifiés et concentrés trois fois donnent les mêmes symptômes. Ceux qui ont été seulement concentrés deux fois donnent une intoxication plus lente.

Il faut donc injecter un produit correspondant à des quantités énormes de lysat (2 cm³ pour une souris) pour provoquer une intoxication.

4° Il n'en est pas moins vrai que l'endotoxine passe dans les lysats, et il paraît prudent d'utiliser pour des essais thérapeutiques des préparations de phages qui en sont dépourvues. Ceci peut être réalisé de trois façons :

a) En préparant les lysats avec une souche peu productrice d'endotoxine (en l'espèce la souche O).

b) En utilisant pour cette préparation une autre espèce bactérienne, sensible au même phage, et peu pathogène pour l'animal d'expérience.

c) En purifiant le lysat par une autre méthode, par exemple par la double adsorption sur phosphate de calcium.

(Institut Pasteur.)

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. BOIVIN et I. et L. MESROBEANU, *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **414**, 307.
- [2] A. BOIVIN et L. MESROBEANU, *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **415**, 304.
- [3] A. BOIVIN et L. MESROBEANU, *C. R. Acad. Sci.*, 1934, **498**, 2211.
- [4] R. WAHL, P. GRABAR, M. ROUYER et L. BLUM-EMERIQUE, ces *Annales*, 1946, **72**, 682.
- [5] R. WAHL et L. BLUM-EMERIQUE, ces *Annales*, 1949, **76**, 103.
- [6] R. WAHL, A. TERRADE et G. MONCEAUX, ces *Annales*, 1950, **79** (sous presse).
- [7] R. WAHL, ces *Annales*, 1950, **79** (sous presse).

RELATIONS ANTIGÉNIQUES ENTRE VIBRION CHOLÉRIQUE ET BRUCELLES

par J. GALLUT.

Parmi les nombreux faits de coagglutinabilité de bactéries d'espèces différentes, ceux qui concernent *Vibrio cholerae* et *Brucella* ont été signalés en premier par Wong et Chow [1] en 1937, puis par Eisele, Mc Cullough, Beal et Rottschaefer [2] en 1947.

Ces différents auteurs ont rapporté que les sérums d'un certain nombre de sujets vaccinés contre le choléra présentaient des agglutinines à un taux significatif pour les *Brucella* : ce taux atteignait 1 p. 40 pour les auteurs chinois et s'élevait de 1 p. 80 à 1 p. 160 dans 20 p. 100 des cas des auteurs américains.

D'après ces derniers le facteur responsable de cette coagglutination appartiendrait à l'antigène non spécifique « H » du vibrion cholérique.

Les résultats expérimentaux rapportés dans cette note tout en confirmant la parenté antigénique de ces deux espèces bactériennes établissent l'existence d'un antigène commun thermostable, qui s'identifie à une fraction de l'antigène cholérique « O ».

1° AGGLUTINATION DES *Brucella* PAR LES SÉRUMS ANTI-CHOLÉRIQUES. —

Les sérums que nous avons utilisés sont ceux dont nous nous servons couramment pour le diagnostic des vibrions cholériques [3] (sérums anti « O » d'un titre supérieur à 1 p. 1.000). Ils ont été essayés simultanément non chauffés et chauffés trente minutes à 56°, avec des résultats identiques, sur des suspensions de trois souches de *Brucella* : *Brucella melitensis* suspension standard pour séro-diagnostic de l'Institut Pasteur (fluorurée à 7. p. 100 et chauffée deux heures à 100°), *Brucella melitensis* souche P 900 [antigène du C. R. F. O. Montpellier] (1) et *Brucella abortus suis* souche de la Collection de l'Institut Pasteur (suspension formolée à 5 p. 1.000). Les agglutinations ont été recherchées par la technique macroscopique en tube, la dilution minima du sérum étant fixée à 1 p. 100.

Les sérums anticholériques n'ont pas tous agglutiné les brucelles, dans les résultats positifs les taux anti-*Brucella* ont été généralement inférieurs aux taux anti-*V. cholerae*, mais exceptionnellement ils ont pu les égaler. Par exemple, le sérum n° 181, contenant les agglutinines cholériques A, C et D, agglutine le vibrion homologue à 1 p. 2.000, *B. melitensis* (souche I. P.) à 1 p. 500, *B. melitensis* (souche P 900) à 1 p. 2.000 et *B. abortus suis* à 1 p. 2.000 également.

Il existe donc bien une parenté antigénique « O » entre les deux germes. Cependant les résultats négatifs fournis par certains sérums anticholériques, notamment les sérums anti-Ogawa (facteurs A et B) montrent que le facteur fondamental A spécifique de *V. cholerae* n'est

(1) Dû à l'obligeance de notre collègue le Dr Jacorot.

pas en cause. Si on néglige les antigènes mineurs [4] les résultats aussi bien positifs que négatifs, confirmés par l'emploi des sérums saturés anti B, C et D nous ont montré que les facteurs C et D sont responsables des co-agglutinations. Les trois souches de *Brucella* utilisées sont en effet agglutinées totalement aux taux suivants :

	SÉRUMS ANTI-CHOLÉRIQUES SPÉCIFIQUES			
	A	B	C	D
<i>B. melitensis</i> (I.P.) . . .	0	0	0	200
<i>B. melitensis</i> (P 900). . .	0	0	0	500
<i>B. abortus suis</i>	0	0	500	500

On sait que pour le diagnostic du choléra, les agglutinations doivent être recherchées avec des suspensions de vibron non chauffés : vivants de préférence [5]. Par cette technique, les vibrions *El Tor* ne se différencient pas des vibrions cholériques authentiques. Toutefois leur composition chimique différente (protéine I de LINTON pour *V. cholerae*, protéine II pour *V. El Tor*) provoque leur comportement sérologique différent après un chauffage de trois heures à 56°. Nous avons soumis des suspensions de *B. abortus suis* (récolté sur gélose après quarante-huit heures à 37°) à un tel chauffage et nous avons constaté que ces germes se comportent comme les vibrions cholériques vrais et non comme les vibrions d'*El Tor*. Ceci a été confirmé par l'emploi d'un sérum antiprotéine de *V. El Tor* : celui-ci n'agglutine pas *B. abortus suis*. N'ayant pas de sérum antiprotéine de *V. cholerae* à notre disposition, nous n'avons pu faire la preuve complémentaire de l'identité des deux protéines de *V. cholerae* et de *B. abortus*, mais il nous paraît que cette hypothèse peut être envisagée *a priori*.

2° AGGLUTINATION DE *V. cholerae* PAR LES SÉRUMS ANTI-*Brucella*.

— Nous avons préparé trois sortes de sérums de lapins :

a) Sérums anti-*B. melitensis* préparés par injections intraveineuses de la suspension standard de l'Institut Pasteur (fluorurée et chauffée à 100°). Le titre homologue atteint 1 p. 1.000, le titre anti-*B. abortus suis* est équivalent ; par contre nous n'avons pu obtenir d'agglutination à 1 p. 100 de *V. cholerae*.

b) Sérums anti-*B. abortus suis* préparés par injections intraveineuses de la suspension formolée à 5 p. 1.000 des germes cultivés quarante-huit heures sur gélose nutritive. Le titre homologue atteint 1 p. 10.000 ainsi que le titre anti-*B. melitensis*. Ces sérums agglutinent *V. cholerae* à 1 p. 500.

c) Sérums anti-*B. abortus suis* préparés par injections intraveineuses de suspensions en eau physiologique chauffées deux heures à 100°. Ces sérums agglutinent le germe homologue ainsi que *B. melitensis* à 1 p. 10.000. Ils agglutinent *V. cholerae* à 1 p. 200.

En somme, les deux sortes de sérums anti-*B. abortus suis* (formolés

et chauffés à 100°) ont confirmé les résultats obtenus avec les sérums anticholériques. Toutefois, les différences entre les taux d'agglutinations directes et croisées sont plus grandes avec les sérums anti-*Brucella* : les titres croisés n'ont pas dépassé le vingtième des titres homologues. Il est donc vraisemblable que nous aurions pu obtenir aussi des agglutinations significatives de *V. cholerae* avec les sérums anti-*B. melitensis*, si ceux-ci avaient pu atteindre un titre aussi élevé que celui décuplé des sérums anti-*B. abortus*.

3° AGGLUTINATION AVEC LES SÉRUMS SATURÉS. — Nous avons procédé à la saturation croisée des sérums anticholériques (A C D) et des sérums anti-*B. abortus suis*. Après saturation par *B. abortus suis* le sérum anticholérique (titre homologue initial 1 p. 2.000) agglutine encore *V. cholerae* à 1 p. 500.

Après saturation par le *V. cholerae* A C D le sérum anti-*B. abortus suis* (titre homologue initial 1 p. 10.000) agglutine encore la brucelle à 1 p. 400.

Si nos connaissances sur la structure antigénique de *V. cholerae* nous permettent d'attribuer au facteur spécifique A l'agglutination résiduelle du sérum anti-cholérique saturé par *Brucella*, par contre, nous ne sommes pas actuellement en mesure de dire si la spécificité du sérum anti-*Brucella* est augmentée après épuisement de ses coagglutinines par le vibron cholérique.

4° RÉACTIONS DES PRÉCIPITINES. — Nous avons préparé par la technique de Boivin à l'acide trichloracétique un antigène dit *glucido-lipidique* extrait de *B. abortus suis*.

Le rendement de cet antigène après purification par dialyse, précipitation par l'alcool, lavages à l'acétone et l'éther, atteint 2,6 p. 100 du poids sec des germes utilisés. Il fournit en eau physiologique des suspensions colloïdales opalescentes très stables (1 mg par centimètre cube) qui précipitent nettement avec les sérums anti-*Brucella* homologue dilués à 1 p. 1.000. Ces solutions précipitent également avec les sérums anticholériques A C D quoique à un taux plus faible (1 p. 100).

Inversement, des solutions d'antigène cholérique (A C D) ont donné des précipitations positives à 1 p. 100 avec tous les sérums anti-*Brucella* que nous avons préparés, soit : *B. melitensis*, *B. abortus suis* formolé et chauffé à 100° et antigène *glucido-lipidique* de *B. abortus suis*.

En conclusion, les résultats fournis par la mise en œuvre des précipitines concordent entièrement avec ceux des épreuves d'agglutination.

Le comportement des substances extraites des deux espèces microbiennes confirme donc bien qu'il s'agit d'une fraction antigénique commune thermostable « O », que nous pouvons assimiler respectivement aux facteurs cholériques D pour les souches *B. melitensis* et D. D. pour la souche *B. abortus suis* que nous avons utilisées.

Il est à noter que le facteur C est l'apanage du *V. cholerae* type *Inaba* épidémique et que le facteur D d'après nos recherches [4] l'accompagne fréquemment. Ces facteurs figurent donc obligatoirement dans les vibrios utilisés pour la fabrication des vaccins anticholériques. Bien

qu'en général le taux des agglutinines spécifiques soit plutôt faible chez les vaccinés [5], nos résultats expérimentaux montrent qu'on peut s'attendre à trouver dans le sérum de ces sujets un titre anti-*Brucella* voisin de 1 p. 100 et un titre certainement plus élevé encore chez des cholériques convalescents.

Nous ne pouvons donc que souscrire à l'assertion de Huddleson [6] qu'il faut, dans les pays où règne le choléra, être prudent dans l'interprétation d'une agglutination positive des *Brucella* par le sérum humain.

(Institut Pasteur.)

BIBLIOGRAPHIE

- [1] WONG et CHOW, *Chinese Med. J.*, 1937, **52**, 591.
- [2] C. W. EISELE, N. B. MC CULLOUGH, G. A. BEAL et W. ROTTSCHAEFER, *J. Amer. med. Assoc.*, 1947, **435**, 983.
- [3] J. GALLUT, ces *Annales*, 1949, **76**, 122.
- [4] W. BURROWS, A. N. MATHER, V. G. MCGANN et S. M. WAGNER, *J. inf. Dis.*, 1946, **79**, 168.
- [5] J. GALLUT et G. BROUNST, ces *Annales*, 1949, **76**, 557.
- [6] HUDDLESON, *Brucellosis in man and animals*, London, 1943, The Common Wealth Fund.

ÉTUDE QUANTITATIVE DE L'HÉMOLYSE PAR LES ACIDES GRAS

(DEUXIÈME NOTE)

par D. G. DERVIGHIAN.

Les résultats rapportés dans une précédente note (1) ont montré qu'il existe, suivant le domaine de concentration en acide laurique dans le milieu, deux régimes différents d'hémolyse.

Au-dessus d'une concentration assez nettement définie, la lyse s'effectue rapidement, en quelques minutes. Pour les dilutions plus grandes, le phénomène change assez brusquement d'allure, de sorte que l'hémolyse ne se produit plus qu'au bout de quelques heures. Cette hémolyse lente ou différée ne se produit, elle aussi, qu'à partir d'une certaine concentration minimum en acide laurique.

On peut ainsi définir, pour chaque valeur du pH, deux concentrations seuils d'acide laurique, la première correspondant à la concentration au-dessus de laquelle apparaît le régime d'hémolyse rapide, la seconde correspondant à la concentration la plus faible, au-dessous de laquelle il n'y a plus lyse différée, même après une dizaine d'heures.

Les quantités minima d'acide laurique nécessaire pour avoir soit l'hémolyse rapide, soit l'hémolyse lente augmentent linéairement avec

(1) D. G. DERVIGHIAN, ces *Annales*, 1949, **77**, 193.

le nombre de globules rouges à lyser. Tout se passe comme si une certaine quantité d'acide gras était immobilisée par les constituants de chaque globule rouge. Les seuils sont définis pour un nombre négligeable de globules à lyser. En plus de cette concentration seuil, il faut une quantité supplémentaire d'acide laurique, d'autant plus grande qu'il y a davantage de globules dans le milieu. On peut donc, en déterminant les quantités d'acide laurique nécessaires à la lyse rapide ou lente de nombres différents de globules rouges, mesurer la quantité d'acide gras immobilisé par globule rouge.

Chacune des concentrations seuils, de même que chacune des quantités d'acide gras fixé, soit pour l'hémolyse rapide, soit pour l'hémolyse lente, varient avec le pH du milieu.

Dans le présent travail, les seuils et les quantités d'acide gras fixé ont été déterminés systématiquement pour une quinzaine de valeurs du pH du milieu comprises entre pH 5,4 et pH 10,3. Les variations et les grandeurs de ces quantités sont comparées aux constantes caractéristiques des acides gras.

Le même mode opératoire et les mêmes conditions que celles décrites dans la précédente note ont été suivis. Les concentrations en acide laurique sont exprimées par rapport au volume total du milieu (volume du milieu + volume de la suspension de globules rouges introduite). Toutes les observations sont faites dans une chambre dont la température est maintenue constante à $23 \pm 0,5^\circ$. Le pH de la solution ou de la suspension aqueuse d'acide laurique est fixé avec des tampons appropriés (phtalate, phosphate ou borate à une concentration de M/100). L'isotonicité est ajustée en ajoutant la quantité nécessaire de KCl. Pour les raisons indiquées (1), le cation utilisé a été toujours l'ion K^+ . Les mélanges ainsi préparés sont placés vingt-quatre heures à l'avance dans la chambre à température constante, afin qu'ils puissent atteindre l'équilibre de température et de dissolution. Juste avant d'être ajoutés, les globules sont lavés une dernière fois au pH étudié.

Tous les résultats se rapportent aux globules rouges du sang de cheval.

Dans le tableau sont rassemblés, d'une part, les deux seuils de concentration exprimés en 10^{-3} M trouvés pour les différents pH et, d'autre part, les quantités d'acide laurique fixé, par globule rouge, soit pour la lyse rapide, soit pour la lyse lente. Les courbes des figures 1 et 2 montrent les variations de ces 2 concentrations seuils en fonction du pH. Sur la figure 1 a été portée en pointillé la courbe de solubilité de l'acide laurique dans l'eau en fonction du pH. Ces solubilités ont été mesurées dans un autre travail (2) en déterminant, pour chaque valeur fixe du pH, la concentration à partir de laquelle on atteint le minimum de la tension superficielle d'une solution aqueuse d'acide laurique (3). On voit qu'entre pH 6 et pH 7,8, les concentrations seuils

(2) D. G. DERVICHIAN, J. GUILARD et H. ROSANO, *Bull. Soc. Chimique de France* (sous presse).

(3) Il est utile de prévenir ici le lecteur contre toute tentation d'établir un rapprochement entre l'hémolyse et le fait que l'on a mesuré les tensions superficielles de ces solutions. La mesure de la tension superficielle est un moyen commode de déterminer la concentration pour laquelle on obtient l'activité thermodynamique maxima, c'est-à-dire la saturation.

pH	CONCENTRATIONS SEUILS		QUANTITÉS FIXÉES PAR GLOBULE	
	Régime rapide	Régime lent	Régime rapide	Régime lent
5,4	0?	0	?	?
5,45	0?	0	?	?
5,8	0,3-0,4 10^{-3} M	0,2 10^{-3} M	3,7 10^{-13} g.	1,5 10^{-13} g.
6,0	0,2-0,4	0,05	3,9	1,9
6,3	0,4	0,2	2,8	1,8
6,75	0,5	0,3	2,2	1,1
7,4	1,2	0,5	1,7	1,0
8,0	1,8	0,9	1,8	1,3
8,1	2,1	1,1	1,4	1,2
8,5	2,3	1,3	1,6	1,0
8,5	2,2	1,2	1,8	1,1
8,95	2,6	1,6	1,6	0,9
9,4	2,8	1,7	2,4	0,6
9,8	2,1	1,5	3,2	0,6
10,3	2,2	1,2	3,8	1,3

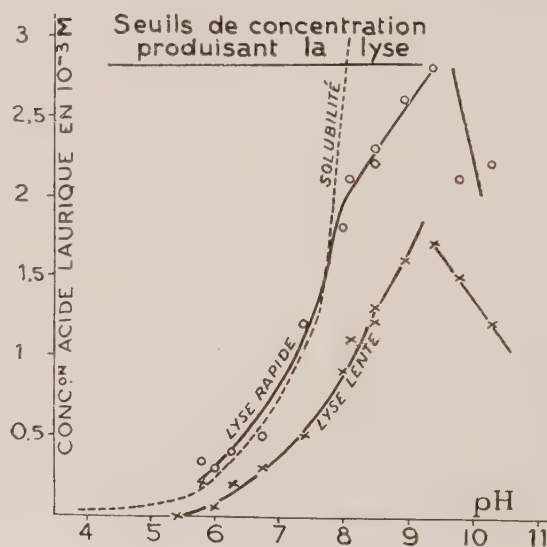


FIG. 1.

produisant l'hémolyse rapide se confondent, aux erreurs d'expérience près, avec les concentrations de saturation de l'acide laurique. Nous pouvons donc dire que, pour qu'il y ait hémolyse rapide, il faut que la solution soit au moins saturée en acide gras entre pH 6 et pH 7,8. Au-dessus de pH 8, les concentrations seuils d'hémolyse rapide s'écartent des concentrations de saturation, devenant plus faibles que celles-ci.

Tout laisse croire que le mécanisme de l'hémolyse est différent, au moins pour l'une des phases du processus, suivant que l'on se trouve dans le domaine compris entre pH 6 et pH 7,8 ou en dehors de ce domaine.

Pour ce qui est des concentrations seuils d'hémolyse lente, elles sont nettement inférieures aux concentrations de saturation. Il n'est pas possible d'établir, pour le moment, une correspondance précise entre ces valeurs de la concentration et les propriétés des solutions d'acide gras. Tout ce que l'on peut dire, c'est qu'il semble qu'à ces mêmes valeurs de la concentration, certains changements apparaissent dans les propriétés des solutions d'acide laurique qui semblent en relation avec le degré d'hydrolyse de l'acide gras.

En plus du changement d'allure de la première des courbes de la

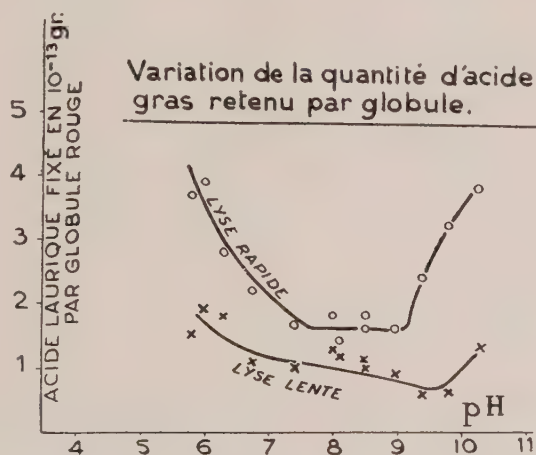


FIG. 2.

figure 1, à partir de pH 7,8 environ, on constate que les courbes des deux seuils (fig. 1) présentent un rebroussement vers 9,5. Ces valeurs particulières du pH ont été déjà reconnues comme étant des points caractéristiques dans les courbes de titrage de l'acide gras (4). La signification de ces valeurs particulières du pH incite à penser que la cause des changements de modalité de l'hémolyse suivant la région du pH ne doit pas être exclusivement recherchée dans la constitution propre du globule rouge, mais tout aussi bien dans les changements des propriétés de l'acide gras utilisé comme hémolysant. Il est évident que ces changements de propriété de l'hémolysant ne peuvent que se répercuter sur son interaction avec les constituants du globule rouge, quels qu'ils soient. On observe une discontinuité dans la vitesse même de la lyse aux environs de pH 8. Alors qu'au-dessous de ce pH, la

(4) D. G. DERVICHIAN et J. KÉPÈS, *Bull. Soc. Chimique de France* (sous presse).

lyse rapide se produit en une dizaine de minutes, la durée est inférieure à une minute dès que l'on dépasse pH 8.

Les conditions sont difficiles à définir au-dessous de pH 5,8 et au-dessus de pH 10,5, car en l'absence même d'acide laurique, les globules rouges ont tendance à lyser au bout d'un temps plus ou moins long. Cependant, alors que, d'une façon générale, l'acide laurique accélère cette lyse, on constate que la durée de la lyse est, au contraire, prolongée en présence de très faibles quantités d'acide laurique, comme s'il y avait un effet protecteur.

En ce qui concerne la quantité d'acide laurique fixée par le globule, on constate qu'elle se met à croître aussi bien dans la région acide que dans la région alcaline des pH. L'accroissement du côté acide au-dessous de pH 7 pourrait être dû au fait que l'on se trouve au-dessous du point iso-électrique de l'hémoglobine et que celle-ci, se comportant alors comme une base, fixerait l'acide gras. La raison de l'accroissement de la quantité fixée au-dessus de pH 9,5 environ devrait être recherchée dans le fait que la valeur du pH 9,5 est en relation avec la neutralisation de l'acide laurique. En tout cas, dans la région moyenne des pH, les quantités d'acide laurique fixé par globule rouge correspondent, respectivement pour chacun des régimes, à environ 0,4 p. 100 et 0,2 p. 100 du poids du globule rouge. Il est intéressant de constater que cette quantité est du même ordre de grandeur que la quantité de corps gras et de cholestérol existant normalement dans le globule rouge, alors qu'elle est incomparablement plus petite que la quantité de protéines.

(Institut Pasteur, Service de Chimie physique.)

ACTION BACTÉRICIDE POUR LE BACILLE DE KOCH DE LA VITAMINE C A DOSES ÉLEVÉES. COMPARAISON AVEC SON ACTION SUR UN CERTAIN NOMBRE D'AUTRES MICROBES

par P. PICHAT et A. REVEILLEAU.

L'action favorisante de la vitamine C à petite dose sur les cultures microbiennes est décrite depuis longtemps. Depuis plusieurs années, nous étudions l'action de la vitamine C à haute dose sur les cultures microbiennes et, en particulier, sur celles du bacille de Koch, les doses étudiées correspondant à celles que l'on trouve dans le sérum et les urines des sujets traités par la vitamine C à haute dose (cette technique étant utilisée par nous depuis bientôt six ans).

Cette étude a fait déjà l'objet de diverses notes (1).

(1) P. PICHAT et MINGEAT, *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 508. — Jean NOIROT, *Thèse Méd.*, Lyon, 1948. — P. PICHAT et A. REVEILLEAU, Action bactéricide *in vitro* de la vitamine C pour le bacille de Koch. — A. REVEILLEAU, *Thèse Pharmacie*, Lyon, 1950 (en préparation).

Nous avons d'abord étudié l'action bactéricide de la vitamine C *in vitro* sur les cultures homogènes de bacille de Koch. Notre technique a été la suivante :

Nous avons utilisé l'acide *l*-ascorbique tamponné par le bicarbonate de soude, de sorte que les pH de nos milieux n'ont pratiquement pas été modifiés.

Trois souches homogènes ont été utilisées avec des résultats semblables, dont la souche originale de S. Arloing et P. Courmont.

Le milieu de culture utilisé a été l'eau peptonée glycinée ; il fut réparti en tubes gradués à raison de 5 cm³ par tube.

La vitamine C a été diluée dans chacun de ces tubes, les dilutions s'échelonnant du 1/100 au 1/100.000, la concentration maxima étant de 0,050 g par 5 cm³.

Ces tubes ont été ensemencés, certaines séries avec 20 millions de bacilles de Koch, d'autres avec 500.000, d'autres, enfin, avec 25.000. Tous ces tubes sont restés plus de deux mois à l'étuve, soigneusement agités plusieurs fois par semaine.

Les tubes témoins ont poussé du quatrième au septième jour ou du sixième au huitième ou du septième au dixième, selon les taux des ensemencements.

N'ont été déclarés bactéricides que les tubes qui n'ont pas poussé *de visu* et dont les réensemencements n'ont pas poussé.

Ces expériences ont été répétées en série et se sont échelonnées sur trois ans.

Nos résultats peuvent se résumer comme suit :

1° Dans les heures qui suivent le début des expériences, les tubes qui correspondent aux concentrations égales ou supérieures à 1/1.000 prennent une coloration rose, quelque peu jaune, qui augmente en deux ou trois jours et se stabilise.

2° La vitamine C présente un pouvoir retardant considérable à haute dose : on observe même un pouvoir bactéricide vrai pour les concentrations égales ou supérieures à 1/200 quand l'ensemencement est de 20 millions, pour les concentrations à 1/500 quand l'ensemencement est de 500.000, pour les concentrations à 1/1.000 quand l'ensemencement est de 25.000. Le pouvoir retardant s'étend respectivement aux concentrations supérieures aux 1/2.000, 1/5.000, 1/10.000.

3° L'étude des réensemencements pratiqués de semaine en semaine montre que, dans les tubes déclarés bactéricides, la mort du bacille a pu survenir avant la fin de la deuxième semaine.

Nous avons ensuite étudié l'action de la vitamine C sur des cultures virulentes de bacille de Koch en utilisant d'une part des milieux à base d'asparagine, phosphate mono-potassique, citrate Mg, sulfate K, c'est-à-dire type Youmans, d'autre part 3 souches différentes de bacille de Koch virulent.

Comme dans les expériences précédentes, nos milieux ont été répartis dans des séries de tubes gradués à 5 cm³. Les quantités ensemencées de microbes ont été approximativement de 500.000 à 1 million dans certaines séries, de 5 à 10 millions dans les autres séries, par tube.

Nos résultats ont été les suivants : les concentrations égales ou supérieures à 1/1.000 sont bactéricides pour le bacille de Koch. Effectivement, aucun des tubes correspondant à ces concentrations n'a

poussé après quatre mois d'étuve. D'autre part, les réensemencements pratiqués ont montré qu'à partir de la deuxième ou de la troisième semaine de l'expérience, les bacilles étaient morts dans les tubes déclarés bactéricides.

En somme, la vitamine C présente *in vitro*, pour les diverses souches de bacille de Koch, un pouvoir bactéricide considérable. Si l'on compare son pouvoir bactéricide sur les bacilles virulents en milieu type Youmans avec celui sur les bacilles en cultures homogènes, on note que, dans les conditions de nos expériences, les bacilles virulents se sont montrés plus sensibles à la vitamine C que les bacilles en cultures homogènes.

D'autre part, nous avons étudié l'action *in vitro* de la vitamine C sur un certain nombre d'autres microbes : soit cocci à Gram positif (4 souches différentes de staphylocoque, 1 d'entérocoque), soit bacilles à Gram négatif (divers types de *Salmonella* : *typhi*, *para B*, Gärtner, Aertrycke, *para C*, *coli*), bactérie charbonneuse, *Proteus*, pyocyanique, vibrion cholérique.

Le milieu d'ensemencement a été le bouillon ordinaire, réparti en tubes gradués de 5 cm³, auxquels on a ajouté la vitamine C, les dilutions s'échelonnant du 1/100 au 1/100.000.

Les ensemencements pratiqués ont été, selon les séries, de 200.000 microbes, 100.000, 50.000, 10.000, 2.000 (ces chiffres étant très approximatifs).

Nos résultats ont été les suivants :

1° La totalité des tubes ensemencés a poussé ;

2° Nous n'avons noté un pouvoir retardant important que dans les tubes ensemencés avec les staphylocoques, et seulement lorsque les ensemencements étaient au maximum de 5.000 à 10.000 cocci, dans les tubes à concentration supérieure à 1/1.000.

3° Sur les *Salmonella*, en particulier, le pouvoir retardant de la vitamine C dans les conditions de nos expériences a été à peu près nul.

CONCLUSION. — La vitamine C (tamponnée par le bicarbonate de soude) présente *in vitro*, aux doses de 1/1.000 à 1/100, un pouvoir bactéricide important pour le bacille de Koch.

Cette action sur le bacille de Koch s'oppose en quelque sorte à celle sur les autres microbes : nous n'avons effectivement pas trouvé de pouvoir bactéricide de la vitamine C pour les autres microbes, mais seulement un pouvoir retardant limité à certains microbes tels que staphylocoque et seulement dans les tubes à concentration vitaminique très élevée.

(Laboratoire de Médecine expérimentale de la Faculté de Lyon.)

**MODIFICATIONS APPORTÉES CHEZ L'HOMME
AU POUVOIR BACTÉRICIDE DU SÉRUM SANGUIN
ET DES URINES PAR L'UTILISATION A HAUTES DOSES
DE LA VITAMINE C : POUVOIR BACTÉRICIDE
POUR LE BACILLE DE KOCH D'UNE PART,
POUR UN CERTAIN NOMBRE D'AUTRES MICROBES
D'AUTRE PART**

par P. PICHAT et A. REVEILLEAU.

Dans les expériences types, nous avons pratiqué des injections intraveineuses de 2, 3 et 4 g de vitamine C (acide l-ascorbique tamponné par le bicarbonate de soude). Sérums et urines ont été prélevés avant injection de vitamine C et trois, six, douze, etc., heures après injection.

La technique de dosage des pouvoirs bactéricides pour le bacille de Koch a été d'abord la suivante : dans des tubes gradués de 5 cm³ et à 1/2, 1/4, 1/8 du tube on dispose le milieu de culture, soit l'eau peptonée glycinée et le liquide dont on veut doser le pouvoir bactéricide, puis on ensemence avec des bacilles de Koch en cultures homogènes.

Chaque recherche de pouvoir bactéricide d'urine comporte 3 tubes contenant respectivement 1/8, 1/4, 1/2 d'urine.

Chaque recherche de pouvoir bactéricide de sérum comporte 2 tubes contenant respectivement 1/8, 1/4 de sérum (dans certains cas nous avons utilisé un troisième tube avec 1/3 de sérum).

Les ensemencements ont été soit de 20 millions, soit de 1 million, soit de 100.000 bacilles, selon nos séries d'expériences.

Nos expériences comportaient évidemment un nombre important de témoins.

Nous ferons remarquer que cette technique ne mesure le pouvoir retardant ou bactéricide du sérum et des urines qu'après les avoir considérablement dilués avec le milieu de culture, ce qui le réduit considérablement : de sorte qu'il peut exister dans le sérum et les urines des sujets traités un certain pouvoir bactéricide non décelable par notre technique.

Nos résultats ont été les suivants :

1° Le pouvoir bactéricide des urines des sujets traités trois heures avant la prise, par une injection intraveineuse d'environ 3 g d'acide l-ascorbique, est considérable : effectivement, dans la majorité des cas, les tubes contenant 1/2 ou 1/4 d'urine n'ont pas poussé et leurs réensemencements, pratiqués quinze jours après le début de l'expérience, sont restés stériles. Le pouvoir retardant est considérable dans les tubes contenant 1/8 seulement d'urine.

Dans les urines qui s'échelonnent de la troisième à la sixième heure après l'injection intraveineuse, le pouvoir bactéricide diminue consi-

dérablement, mais il persiste encore un pouvoir retardant important quinze heures après l'injection intraveineuse.

2° Le pouvoir bactéricide du sérum sanguin pour le bacille de Koch est nul dans les conditions de nos mesures, c'est-à-dire après dilution aux 3/4, aux 7/8 de sérum avec l'eau peptonée glycinée. On ne note qu'exceptionnellement des pouvoirs retardants importants.

3° En même temps que nos dosages de pouvoir bactéricide, nous avons pratiqué des dosages de pouvoir réducteur par la méthode iodométrique et de vitamine C par l'électro-photomètre de Meunier : de la comparaison des chiffres des pouvoirs bactéricides ou retardants d'une part, et, d'autre part, des chiffres des pouvoirs réducteurs ou des taux de vitamine C, nous avons tiré les conclusions suivantes :

a) Il existe un certain parallélisme entre pouvoirs bactéricides d'une part et pouvoirs réducteurs d'autre part, en ce sens que les pouvoirs bactéricides importants s'accompagnent toujours d'un pouvoir réducteur élevé et inversement ; les taux de vitamine C sont toujours trouvés importants quand les pouvoirs bactéricides sont importants.

b) Mais il ne s'agit que d'un parallélisme relatif. Il est impossible, même en tenant compte largement des coefficients d'erreurs de nos techniques, de donner à un liquide, sérum ou urine, qui présente un coefficient déterminé de pouvoir réducteur et un taux déterminé d'acide ascorbique, un pouvoir bactéricide déterminé. En particulier, il semble que dans les urines des deuxième et troisième émissions qui sont seulement retardantes, il n'y a pas de parallélisme entre pouvoir retardant parfois très conservé et taux d'acide ascorbique très réduit.

c) Il n'y a pas non plus de parallélisme exact entre l'action bactéricide *in vitro* de la vitamine C et l'action bactéricide des urines des sujets traités par la vitamine C.

Dans toute une série d'autres expériences, nous avons utilisé comme milieu d'ensemencement un milieu type Youmans et des bacilles de Koch virulents, à raison soit de 500.000 à 1 million, soit de 5 à 10 millions par tube.

Dans ces conditions, nos résultats se rapprochent des résultats précédemment établis, c'est-à-dire qu'il existe dans les urines un pouvoir bactéricide considérable, ce pouvoir bactéricide n'étant pas retrouvé dans le sérum, si ce n'est sous forme d'un pouvoir retardant inconstant (dans les conditions et avec les défauts déjà signalés de notre technique). Il semble même que l'utilisation du milieu de Youmans et de bacilles de Koch virulents donne des chiffres plus élevés du pouvoir bactéricide dans les urines.

Enfin, dans d'autres séries d'expériences, nous avons utilisé comme milieu d'ensemencement du bouillon ordinaire et comme microbes ensemencés soit des cocci à Gram positif (diverses variétés de staphylocoque et un entérocoque), soit des bacilles à Gram négatif (*S. typhi*, *para A*, Gärtner, Aertrycke, *para C*, *coli*), vibron cholérique, pyocyanique. Dans ces conditions, nous n'avons trouvé aucun pouvoir bactéricide ou retardant dans les sérums, aucun pouvoir bactéricide dans les urines, mais seulement un pouvoir retardant pour le staphylocoque des urines des sujets traités par la vitamine C. Nous avons noté en particulier l'absence complète de tout pouvoir retardant pour les *Salmonella* des urines des sujets traités par la vitamine C.

Nous ajouterons qu'au cours de ces recherches, qui datent de trois ans et qui ont fait l'objet de notes antérieures (1), un certain nombre de dosages ont été pratiqués chez des sujets recevant l'acide ascorbique à hautes doses, mais avec d'autres modalités.

Les résultats de nos recherches peuvent se résumer ainsi :

1° Chez les sujets traités par la vitamine C à hautes doses, on voit apparaître, dans les urines en particulier, un pouvoir bactéricide considérable pour le bacille de Koch, soit bacilles en cultures homogènes, soit bacilles virulents en cultures en milieu type Youmans. Ce pouvoir bactéricide est beaucoup plus difficile à constater dans le sérum.

2° Chez ces mêmes sujets, traités par la vitamine C à hautes doses, on ne trouve pas, même dans les urines, un pouvoir bactéricide important pour la plupart des microbes autres que le bacille de Koch : nous n'avons trouvé de pouvoir retardant notable que pour les cocci à Gram positif, en particulier pour le staphylocoque.

De sorte qu'il y a une opposition entre l'action de la vitamine C *in vivo* sur le bacille de Koch et son action *in vivo* sur les autres microbes, en particulier sur les microbes type *Salmonella*.

3° Il y a un certain parallélisme entre taux bactéricide et taux d'acide ascorbique, en ce sens qu'un pouvoir bactéricide élevé correspond à un taux d'acide ascorbique élevé et inversement, mais ce parallélisme est loin d'être absolu.

(Laboratoire de Médecine expérimentale de la Faculté de Lyon.)

RÉACTION D'HÉMAGGLUTINATION TYPE MIDDLEBROOK-DUBOS RÉALISÉE AVEC LES HÉMATIES HUMAINES O ET LA NOUVELLE TUBERCULINE I.P. 48

par R. SOHIER, I. TRIMBERGER et J. JUILLARD. (*)

Dans une précédente note (1) nous avons relaté un essai de simplification de l'intéressante méthode d'hémagglutination de Middlebrook et Dubos utilisable pour le diagnostic sérologique de l'infection tuber-

(1) Jean NOIROT, *Thèse Méd.*, Lyon, 1948. — P. PICHAT et MINGEAT, *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 508. — P. PICHAT et REVEILLEAU, *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 1063. — P. PICHAT, *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 1065. — P. PICHAT et A. REVEILLEAU, *C. R. Soc. Biol.*, Réunion Lyon, 5 juin 1950.

(*) Travail effectué avec l'aide de la Caisse nationale de Sécurité sociale.

(1) R. SOHIER, ces *Annales*, 1950, **78**, 283, 289.

(2) Nous remercions M. le Dr Bretey qui nous a remis ce produit et a bien voulu nous donner de très utiles conseils pour son emploi. Nous devons attirer l'attention sur le fait que les ampoules actuellement délivrées ne peuvent être utilisées pour la réaction d'hémagglutination, tant en raison du nombre trop faible d'unités qu'elles contiennent que des modifications pouvant intervenir sur la réaction d'hémagglutination après lyophilisation.

culeuse. En remplaçant les hématies de mouton par les hématies humaines O on supprimait en effet le temps préalable d'absorption des agglutinines naturelles anti-mouton. Les premiers résultats obtenus étaient encourageants. Ayant effectué à ce jour 236 réactions avec les hématies humaines, nous croyons pouvoir rapporter nos constatations. Elles ne se limitent d'ailleurs pas à l'usage de ces hématies car elles comportent un fait nouveau concernant l'usage d'une nouvelle tuberculine purifiée par absorption dite I. P. 48 préparée par l'Institut Pasteur de Paris (du moins pour 191 réactions).

TECHNIQUE. — La technique utilisée a été celle que nous avons précédemment employée avec les hématies de mouton.

Hématies humaines du groupe O recueillies en liquide d'Alsever utilisées trois jours après la récolte et pouvant être conservées au frigidaire au moins quatre semaines. Lavage soigneux avant emploi dans six fois le volume initial d'eau physiologique, trois fois de suite. Extrait de bacilles tuberculeux : tuberculine I. P. 48 en poudre (2) titrant une unité pour 0,000.025 mg. Préparation au moment de l'emploi de 5 cm³ de solution contenant 3 mg., soit 25.000 unités par centimètre cube.

Fixation de la tuberculine sur les hématies : 0,05 cm³ de culot d'hématies pour 1 cm³ de solution de tuberculine ; contact deux heures à 37°.

Réaction : sérum dilué à 1/2, puis inactivé trente minutes à 56°. Répartition dans des tubes de Vernes de 0,3 cm³ pour le premier et 0,3 cm³ pour le second, qui contient déjà 0,3 cm³ d'eau physiologique, dilutions successives, par passage de tube en tube contenant 0,3 cm³ d'eau physiologique, de 0,3 cm³ du mélange du deuxième tube. On obtient ainsi des dilutions de 1/2, 1/9, 1/8, 1/16, 1/32, etc.

Addition de 0,05 de suspensions d'hématies ayant fixé la tuberculine diluée au 1/80.

Lecture après deux heures d'étuve à 37° par examen des tubes secoués au-dessus d'un miroir concave.

On doit savoir que si le tube témoin (0,3 de sérum inactivé additionné d'une suspension d'hématies O diluées à 1/80 non sensibilisées) donne le plus souvent une suspension parfaitement homogène, il arrive qu'on observe un très fin granité qui, d'ailleurs, est très facilement différencié des agglutinations vraies d'hématies ayant fixé la tuberculine en présence d'un sérum positif.

RÉSULTATS OBTENUS. — Nous rapporterons successivement ceux observés pour diverses catégories de sujets.

a) *Sujets tuberculeux.* — Sur 31 malades atteintes de lésions pulmonaires à divers stades, pleurales, miliaires, méningites tuberculeuses. primo-infection en évolution, on obtient 23 réactions positives et 8 réactions négatives.

Parmi celles-ci, 6 concernent des sujets atteints de formes très graves, arrivées à la période terminale, et 2 des malades ayant une primo-infection bacillaire à son début ; pour ces 2 sujets, la réaction, refaite respectivement dix jours et onze jours après, était nettement positive.

Chez 4 enfants ayant eu antérieurement des primo-infections, mais sans signes d'évolution et d'activité au moment du prélèvement, la réaction était négative : même résultat chez un cinquième enfant guéri d'une péritonite tuberculeuse grave traitée par la streptomycine.

Pour 3 autres enfants ayant eu une primo-infection, mais sur l'état desquels nous n'avons pu avoir de précisions, la réaction était négative.

En résumé, la réaction a toujours été positive (taux $\geq 1/18$) chez les sujets ayant des lésions tuberculeuses en évolution. Notons que les taux les plus élevés ont été observés au cours des méningites tuberculeuses, des miliaries et de formes diverses de primo-infection.

b) *Sujets atteints de maladies diverses de nature non tuberculeuse.* — Il s'agissait de malades d'hôpitaux au nombre de 64 parmi lesquels on a trouvé 56 réactions négatives (87,5) et 8 positives (12,5 p. 100).

Parmi celles-ci, on relève les diagnostics suivants : 1 amibiase, 2 paludismes, 1 rhumatisme articulaire aigu, 1 angine, 1 séquelle de polionmyélite, 2 affections de nature indéterminée.

c) *Sujets apparemment normaux.* — 1° 23 adultes : négatifs, 20 (86,9 p. 100) ; positifs, 3 (13,1 p. 100), ces sujets ayant des épreuves tuberculiniques ou bacillaires positives ; 2° 68 enfants : négatifs, 65 (95,5 p. 100) ; positifs, 3 (4,5 p. 100) ; 3° 30 vieillards : négatifs, 29 (96,6 p. 100) ; positifs, 3 (3,4 p. 100).

Animaux :

Nous avons cru utile de vérifier le comportement de la réaction aux hématies humaines O avec du sérum (préalablement absorbé par les dites hématies) de lapins inoculés avec du BCG ou de bovidés tuberculeux. Sur 11 animaux, nous avons obtenu les mêmes résultats qu'avec les hématies de mouton.

Il pouvait être intéressant de comparer ces résultats donnés par les hématies de mouton et ceux obtenus avec les hématies humaines O, ce que nous avons fait pour tous nos sérums.

Nous avons constaté les faits essentiels suivants :

Avec les sérums humains provenant de sujets ayant des lésions tuberculeuses en évolution et avec ceux des animaux artificiellement ou spontanément tuberculisés, les réactions étaient positives avec les deux méthodes. Tout au plus pouvait-on observer, dans quelques cas, des taux un peu plus bas avec les hématies humaines O.

Par contre, pour les sujets malades ou apparemment normaux, le nombre de résultats positifs en quelque sorte « inattendus » était beaucoup plus faible avec les hématies humaines O qu'avec les hématies de mouton (adultes, 12,5 p. 100 au lieu de 33 p. 100 ; enfants, 4,5 p. 100 au lieu de 9,6 p. 100 ; vieillards, 3,5 p. 100 au lieu de 7,1 p. 100).

Dans un article récent, Ch. Gernez-Rieux et A. Tacquet (3), tout en reconnaissant l'intérêt de l'emploi de la tuberculine précipitée que nous avons proposée, attiraient l'attention sur le fait que ce produit et la technique que nous utilisions donnaient plus de résultats positifs (16 p. 100) chez des sujets apparemment normaux que la méthode originale de Middlebrook et Dubos avec leur extrait spécial de bacilles tuberculeux (4 p. 100).

On constatera que, tout en conservant notre méthode, mais en utilisant les hématies humaines O et la nouvelle tuberculine précipitée I. P. 48, les résultats obtenus sont (à condition de les lire après deux heures à 37°) très voisins de ceux rapportés par Middlebrook et Dubos et par Gernez-Rieux et Tacquet après usage d'hématies de mouton et d'un extrait de bacilles tuberculeux spécialement préparés pour la réaction d'hémagglutination [Positivité constante dans les

tuberculoses évolutives pulmonaires ou pleurales, les primo-infections, les miliaires. Positivité à des taux faibles chez les sujets apparemment non tuberculeux. A titre d'exemple : 9 p. 100 de réactions positives pour 100 enfants allergiques ou non allergiques pour Gernez-Rieux et Tacquet, contre 4,5 p. 100 avec notre technique].

En résumé, la réaction d'hémagglutination du type Middlebrook-Dubos peut être effectuée (ce qui constitue une simplification notable, avec des hématies humaines du groupe O ayant fixé la nouvelle tuberculine purifiée I. P. 48, mais également d'autres extraits bacillaires (3).

Les résultats obtenus après 236 réactions sont très comparables à ceux rapportés à ce jour avec la technique originelle employant des hématies de mouton et un extrait spécial de bacilles tuberculeux.

(Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon.)

ÉPREUVES CUTANÉES AUX SUSPENSIONS DE BACILLES BCG TUÉS. RÉSULTATS OBTENUS (*)

par R. SOHIER, J. GOUTAYER et H. GOUTAYER.

Si plusieurs travaux concernent les réactions cutanées aux suspensions de bacilles tuberculeux avirulents et morts ont été publiés en France et en particulier dans ces *Annales*, il en est peu qui aient rapporté des enquêtes faites sur de nombreux sujets dans le but de dépister une infection tuberculeuse latente.

Les travaux de Boquet et Nègre concernaient des recherches effectuées chez l'animal et même celles récentes de Valtis et van Deinse. Les intéressantes constatations de Chaussinand ouvrant en France la voie à de telles investigations chez l'homme étaient limitées à des enfants. Weill-Hallé ne donnait pas de précisions sur le nombre des examens effectués. On doit rappeler aussi la contribution apportée par les médecins étudiant l'action du BCG chez les tuberculeux (Coulaud, Corre, Gernez-Rieux, Arnaud et Chevalier, Boquet, etc.).

Hors de notre pays, des prospections importantes étaient réalisées après les études préliminaires de Carlinfanti, Thorkildsen, pour déceler par l'épreuve bacillaire l'infection tuberculeuse latente non révélée par l'allergie tuberculinique. Parmi les plus importantes figurent celles de Rosenberg, Andenoes, Frappier et Guy, Uvstedt et Anonsen.

D'autres concernaient les réactions obtenues chez les sujets vaccinés au BCG.

Mais la plupart des travaux avaient été réalisés avec des suspensions de bacilles vivants.

Ayant effectué l'épreuve aux bacilles tués chez un certain nombre d'individus au cours de recherches sur les méthodes indirectes de diagnostic de l'infection tuberculeuse et encore qu'il soit nécessaire de

(3) La tuberculine dite « purifiée » de l'Institut Pasteur peut être utilisée à la concentration de 10.000 unités par centimètre cube.

(*) Travail effectué avec l'aide de la Caisse nationale de Sécurité sociale.

compléter les premières investigations par de nombreux contrôles, nous avons cru devoir rapporter dès maintenant les résultats obtenus.

La technique adoptée pour obtenir la pénétration des germes dans le tissu conjonctif dermique a été celle de A. Frappier et R. Guy (1) : scarification du tégument à travers 1 goutte de suspension à l'aide d'une aiguille pleine, ce qui permet des effractions très régulières et à peu près identiques entre elles, quelle que soit la résistance de l'épithélium du revêtement.

Après avoir utilisé le vaccin BCG vivant (vaccin pour scarification de l'Institut Pasteur que nous faisons pénétrer soit par piqûre à l'aiguille pleine [méthode type Trambusti-Savonen], soit par scarification [technique précitée]), nous avons abandonné les suspensions de germes vivants.

En effet, on constatait, surtout avec la méthode par piqûre et comme l'avaient vu Chaussinand, puis plus récemment Weill-Hallé, après injections intradermiques des suppurations parfois importantes et trainantes, véritables petits abcès froids suivis de cicatrices durables : d'autre part, l'introduction de ces germes réalisait une véritable vaccination modifiant les réactions de l'organisme et rendant difficiles certaines observations (en particulier sérologiques) que nous désirions faire. On se trouvait par ailleurs obligé, lorsqu'elles précédaient une vaccination normale, d'effectuer celle-ci immédiatement sous peine de voir apparaître après elle des réactions importantes.

Nous rapporterons seulement ici les résultats obtenus avec une suspension de bacilles morts.

L'épreuve consistait en une scarification non saignante (apparition du derme rosé et léger piqueté rougeâtre) effectuée avec une aiguille de phonographe à travers une goutte de suspension de BCG à 75 mg par millilitre, tué par chauffage à 100° au bain-marie une heure, et conservée ensuite au réfrigérateur à + 4°. Lecture le deuxième et le septième jour et, pour beaucoup de réactions, observation au cours des semaines suivantes. Positivité appréciée en notant l'importance de l'infiltration palpable et éventuellement la présence de croûtes et supuration.

Cette épreuve bacillaire effectuée chez 372 sujets apparemment normaux a donné les résultats suivants :

Chez 209 sujets réagissant à la tuberculine, la réaction a toujours été positive.

Sur 161 sujets pour lesquels les épreuves tuberculiniques (effectuées soit avec une méthode à l'aiguille correspondant au moins à 50 unités, soit par intradermo-réaction de Mantoux à 100 unités) étaient négatives, 36 ont réagi nettement à l'épreuve bacillaire, soit 22,3 p. 100.

Il n'est pas sans intérêt de noter que, dans les pays où la même recherche a été effectuée par diverses méthodes utilisant des bacilles vivants, les taux de positivité chez les sujets non sensibles à la tuberculine ont été voisins de ceux trouvés par nous (Rosemberg : sur 377 sujets 27,6 p. 100 ; Andenoes, sur 111 sujets 17,1 p. 100 ; A. Frappier et R. Guy, sur 626 sujets 22,9 p. 100).

(1) Nous l'avons vu pratiquer au Canada par A. Frappier et R. Guy, que nous tenons à remercier ici pour leur si aimable accueil.

La question a été posée de savoir si les suspensions de bacilles morts donnaient des résultats comparables à ceux obtenus avec des germes vivants.

Chaussinand réalise une épreuve satisfaisante avec une suspension de diverses souches de bacilles de Koch ou de BCG tués contenant 0,1 mg pour 0,1 ml.

Thomassen, par la méthode des piqûres, a obtenu des différences notables entre les suspensions tuées et vivantes, Uvstedt indiquait qu'on obtenait les mêmes résultats en remplaçant la suspension à 20 mg par millilitre de BCG vivant par celles contenant 50 mg de BCG ou de bacilles tuberculeux humains virulents tués à 100°. A. Frappier et R. Guy opérant sur un petit nombre de cas notaient des réactions un peu moins fortes et moins persistantes avec des suspensions de germes tués (concentration à 10 mg).

Nous constatations conduisent à admettre que la forte concentration de 75 mg de germes tués révèle un pourcentage de sujets sensibles voisin de ceux trouvés avec les bacilles vivants avec des concentrations nettement plus faibles (10 à 25 mg taux optimum pour A. Frappier et R. Guy).

Il était utile d'étudier le comportement des sujets aux différents âges.

Nous avons obtenu des réactions positives aux taux suivants : chez l'enfant 10 p. 100, chez l'adulte 25 p. 100, chez le vieillard 100 p. 100.

Une telle constatation ne saurait étonner si l'on admet que l'épreuve bacillaire révèle une infection tuberculeuse latente. Elle pourrait être aussi considérée comme un argument en faveur de la persistance de cette infection latente, contrairement à ce que certaines investigations effectuées avec la tuberculine avaient fait admettre. De telles observations révélant une infection que l'absence d'allergie tuberculinique conduirait à écarter, doivent contribuer à une meilleure interprétation de la signification de certaines formes de tuberculose, comme le montraient récemment A. Dufourt et J. Brun (2).

Nous avons étudié également l'épreuve bacillaire chez 45 sujets vaccinés au BCG par scarifications et constaté les faits suivants :

Les réactions vaccinales, ainsi qu'on pouvait le prévoir, ont été nettement plus importantes et plus fréquentes chez les sujets dont le tégument réagissait au contact de la suspension bacillaire.

Si l'on considère comme des réactions fortes celles comportant une infiltration importante avec suppurations et croûtes des zones scarifiées et adénopathies satellites notables (bien que toujours spontanément et assez rapidement résorbées), on les observe à un taux de 53 p. 100 lorsque l'épreuve était positive et de 13,3 p. 100 quand elle était négative. Mais la différence apparaît plus nettement en tenant compte de l'importance de la positivité de l'épreuve : forte, elle correspond à 83,3 p. 100 de réactions, faible et tardive, à 8,3 p. 100. De même pour les négatives : les infiltrations douteuses fugaces que l'on doit considérer comme réactions négatives correspondent à 28,5 p. 100 de réactions, celles complètement et constamment négatives à 5 p. 100.

Ainsi une épreuve bacillaire positive pourra faire prévoir l'intensité

(2) A. DUFOURT et J. BRUN, *Concours médical*, 1949, 74, 407.

de la réaction vaccinale mais il arrivera qu'elle ne se produira pas ou qu'une épreuve négative sera suivie d'une réaction notable.

Si l'on recherche les *conditions d'acquisition de l'allergie* en fonction de l'épreuve préalable aux bacilles, on observe des discordances encore plus importantes.

Des réactions tuberculiniques effectuées deux mois après la vaccination étaient fortement positives dans 33 p. 100 des cas et moyennement dans 47,7 p. 100, douteuses dans 16,6 p. 100 chez les sujets ayant eu une épreuve bacillaire pré-vaccinale positive. Chez ceux pour lesquels elle avait été négative, on relève après vaccination une allergie tuberculinique forte dans 26,9 p. 100 des cas, moyenne dans 57 p. 100, douteuse dans 7,4 p. 100.

A s'en tenir à nos constatations, il n'y a pas de rapport entre la réaction cutanée aux bacilles BCG morts avant vaccination et l'intensité de l'allergie tuberculinique acquise par vaccination par le BCG vivant.

Si l'on étudie le phénomène de l'*activation post-vaccinale* des épreuves tuberculiniques effectuées avant vaccination, on note qu'il a été observé six fois chez des sujets ayant une épreuve bacillaire positive avant vaccination, dix-sept fois chez ceux pour lesquels elle était négative.

En résumé : Une épreuve cutanée a été effectuée chez 417 sujets par scarification à l'aiguille pleine à travers 1 goutte de suspension de bacilles BCG tués par chauffage à 100°.

Elle a toujours été positive lorsque les réactions cutanées tuberculiniques étaient également positives.

Chez les sujets ne réagissant pas à la tuberculine l'épreuve a été positive dans 22,3 p. 100 des cas. Les taux de positivité étaient minima chez l'enfant et maxima chez les vieillards. Il y a toutes raisons d'admettre qu'elle révèle bien la proportion d'infectés latents non sensibles à la tuberculine.

Une épreuve aux bacilles positive est suivie beaucoup plus souvent de réactions vaccinales locales notables que lorsqu'elle est négative, mais celles-ci peuvent être observées chez des sujets ne réagissant pas aux suspensions bacillaires avant vaccination.

Il ne paraît pas y avoir de rapport entre la réaction cutanée aux bacilles morts et l'intensité de l'allergie tuberculinique acquise par vaccination, non plus qu'avec l'activation vaccinale d'épreuves tuberculiniques faites avant vaccination.

L'épreuve cutanée aux suspensions de bacilles morts mérite de prendre place à côté de celles effectuées avec la tuberculine pour déceler l'infection tuberculeuse latente (3).

(Hôpital d'Instruction Desgenettes et Laboratoire d'Hygiène
de la Faculté de Médecine de Lyon.)

(3) On trouvera la bibliographie relative à cette question et, en particulier, les références relatives à tous les noms cités ci-dessus, dans le récent et très complet travail de A. Frappier et R. Guy (*Canadian Publ. Health J.*, 1950, 44, 72) et dans celui de R. Sohler et R. Kourilsky : *Méthodes indirectes de diagnostic de l'infection tuberculeuse, Rapport du Congrès de Biologie Clinique*, Lyon, 1950, à paraître prochainement dans les *Annales de Biologie clinique* 1950.

SUR L'EXTRACTION DES HUMATES ET L'EMPLOI DE CES EXTRAITS DANS LES MILIEUX DESTINÉS À LA CULTURE DES MICROBES DU SOL

par HÉLÈNE WINOGRADSKY.

S. Winogradsky (1), dans sa méthode d'examen direct du sol, s'est servi, en 1926, pour déterminer la population microbienne humivore, d'un extrait d'humates de calcium. En 1932 et à partir de 1934, le même auteur s'est servi d'un extrait d'humates dans la lessive de potasse à 10 p. 100, conservé en solution alcaline, qu'il ajoutait aux milieux destinés à la culture des *Azotobacter* et des nitrificateurs à raison de V gouttes par litre de milieu. Cette addition semblait stimuler les pullulations.

Voici, brièvement résumés, les deux modes d'extraction :

Extraction par la lessive de potasse à 10 p. 100. — A. 100 g de terreau (fumier consommé ou terreau de couches), ajouter 100 cm³ de HCl à peu près N ;

Laisser macérer pendant vingt-quatre heures en remuant de temps en temps. Décanter ;

Ajouter 250 cm³ de KOH à 10 p. 100. Bien remuer, puis laisser déposer. Décanter ;

Ajouter HCl (même concentration que ci-dessus) goutte à goutte jusqu'à réaction acide. Agiter. Il se forme un précipité brunâtre, floconneux, qu'on laisse déposer. On décante le liquide surnageant. On lave avec de l'eau distillée à plusieurs reprises ;

Dissoudre le précipité dans la lessive de potasse, reprécipiter par l'acide chlorhydrique comme ci-dessus à plusieurs reprises. On filtre sur Buchner, en lavant avec de l'eau distillée chaude.

On répète cette opération avec 7 ou 8 lots de 100 g de terreau et on dissout les humates obtenus dans 250 cm³ de lessive de potasse N/10, car il est malaisé d'opérer avec plus de 100 g de terreau.

Pour avoir une idée de la concentration approximative de la solution de l'ensemble des précipités, on sèche un des lots jusqu'à poids constant et l'on en déduit le poids approché d'humate total dissous.

On stérilise la solution à l'autoclave. Nous avons constaté qu'elle se conserve très bien en flacon bouché hermétiquement.

Extraction des humates de calcium. — A 10 g de terreau (ou n'importe quel échantillon de terre riche en matières végétales décomposées) on ajoute 200 cm³ de HCl à 1 p. 100 et on laisse macérer pendant vingt-quatre heures. Décanter et laver ;

Ajouter 100 cm³ de NH₃ à peu près N sur le sédiment. Laisser macérer à l'étau vingt-quatre heures. Filtrer (ou centrifuger). Chauffer le filtrat au bain-marie pour éliminer NH₃ en excès en ajoutant de l'eau distillée, si

(1) S. WINOGRADSKY, *Microbiologie du sol*, œuvres complètes, Paris, 1949.

nécessaire, pour éviter que la solution se concentre. On étend avec de l'eau et on précipite par addition de 10 g de chlorure de calcium. On filtre sur Buchner et on lave jusqu'à disparition de l'excès de chlorure ; Mettre le précipité en suspension dans 50 cm³ d'eau distillée environ. On stérilise à l'autoclave et on conserve au frigidaire en flacon bouché hermétiquement.

Les humates ayant une composition très variable (2), une partie du précipité risque d'être redissoute au dernier lavage, il est donc préférable de ne pas prolonger l'opération outre mesure. Si, dans ce cas, on constate que le filtrat est très fortement coloré, on ajoute à une petite quantité de ce liquide du chlorure de calcium ; s'il se forme un précipité on reprécipite la totalité du filtrat comme ci-dessus. On essaye de même avec l'ammoniaque.

Divers auteurs ont employé plusieurs méthodes différentes pour l'extraction des humates. Nous avons décrit celle que nous avons utilisée parce qu'elle nous a paru donner de bons résultats.

Les deux extraits, dont nous venons de décrire la préparation, peuvent être employés suivant les cas.

L'extrait alcalin présente l'avantage d'être très difficilement contaminable, donc facile à conserver, mais il augmente fortement le pH du milieu auquel il est ajouté.

Par contre, l'extrait à l'humate de calcium, en suspension aqueuse, est plus difficile à conserver. Il faut le surveiller et le restériliser. Son emploi serait indiqué pour la culture d'espèces microbiennes provenant de terrains calcaires.

Dans notre cas particulier, son emploi nous intéressait pour la culture de certains Actinomycétates dont il sera question dans la communication suivante.

(Institut Pasteur. Service de M. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.)

LIVRES REÇUS

H. J. Parish. — *Notes on Communicable Diseases of laboratory Animals.*
E. and S. Livingstone Ltd, Edinburgh, 1950, 69 pages, 19 × 13 cm.

Cet ouvrage, de la taille d'une brochure et animé des meilleures intentions, expose de façon condensée et schématique les maladies dont sont susceptibles d'être atteints les animaux de laboratoire ainsi que les remèdes à y apporter. Il s'agit malheureusement d'une énumération assez sèche qui n'est relativement complète que pour les maladies bactériennes. Les maladies à virus, si importantes pour les animaux de laboratoire, y sont à peine mentionnées et certaines, parmi les plus importantes, passées sous silence. Il est à souhaiter, dans une édition ultérieure, que cet ouvrage, dont le principe est excellent, soit revu et largement complété.

P. L.

(2) S. A. WAKSMAN, *Humus*, Baltimore, 1938.

Report of the Medical Research Council for the years 1945-1948, His Majesty's Stationery Office, London, 1949, 283 pages, 24 × 15 cm. Prix : 5 sh.

Exposé des recherches poursuivies en Grande-Bretagne de 1945 à 1948 sous l'égide du Medical Research Council. Il s'agit d'un rapport officiel où l'on trouvera une documentation utile sur les sujets traités et sur les travailleurs qui ont participé à ces recherches.

P. L.

Ludwig Kratz. — *Die Glaselektrode und ihre Anwendungen*. 1 vol., 377 pages, 77 fig. Dietrich Steinkopff, édit., Frankfurt/Main, 1950. Prix : broché, D. M. 41,50 ; relié, D. M. 44.

Après quelques considérations générales sur le pH, l'auteur étudie les fondements et les méthodes de la mesure du pH au moyen des électrodes de verre, puis l'emploi de celles-ci dans les différents domaines de la chimie (en particulier de la chimie des colloïdes), en biologie, en bactériologie, en physiologie et en médecine. Une bibliographie de 36 pages, donnant la liste des travaux depuis 1875, complète le volume.

P. L.

Hans Schmidt. — *Fortschritte der Serologie*. Lieferung 1. 1 vol. 64 pages, 6 fig. Dietrich Steinkopff, édit., Frankfurt/Main, 1950. Prix : D. M. 6.

Premier fascicule de ce travail, dont les autres suivront tous les mois, et qui étudie les antigènes (généralités, spécificité), les anticorps (nature, caractéristiques physiques, purification, formation, anticorps artificiels), la fixation de l'anticorps sur l'antigène et enfin certaines réactions sérologiques particulières : hémagglutination, bactériolyse, anticorps anti-enzymes, etc.

P. L.

Le Gérant : G. MASSON.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°.)

EXTRAIT DES STATUTS :

Article premier. — L'association dite Association des Microbiologistes de Langue Française, fondée en 1937, à Paris, a pour but de grouper les microbiologistes de langue française et de créer entre eux un lien. Elle a son siège à Paris.

L'association se compose de membres nationaux et de membres étrangers de toutes langues.

La langue française est la langue officielle des Congrès de l'Association et de la publication de ses travaux.

Art. 2. — L'A. M. L. F. est instituée uniquement pour l'étude et la discussion en commun de toutes les disciplines relevant de la science microbiologique.

Art. 3. — Les membres nationaux de l'A. M. L. F., ainsi que les membres étrangers résidant habituellement en France constituent la Section française de l'A. M. L. F. ou SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE. La Section française de l'A. M. L. F. reçoit dans l'intervalle des congrès une délégation permanente du Conseil de l'A. M. L. F. Son activité est régie par un règlement intérieur, approuvé par l'Assemblée Générale.

Art. 4. — La Section française de l'A. M. L. F. ou SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE, constitue de plein droit la Section française de l'Association internationale de Microbiologie.

Art. 5. — Peut faire partie de l'Association toute personne remplissant une fonction scientifique dans un laboratoire de microbiologie (microbiologie pure ou appliquée, bactériologie, pathologie infectieuse, immunologie, sérologie, chimiothérapie, cancérologie), ou ayant publié des travaux scientifiques de microbiologie.

Art. 23. — **Publications** — Les publications des travaux exposés dans les séances mensuelles se font dans les conditions et selon les modalités décidées par le Bureau de la Section française.

Le Bureau peut refuser de publier tout travail ou communication, qui ne serait pas conforme aux buts de l'association ou au caractère de ses publications. Ses décisions sont sans recours.

Art. 27. — Les auteurs des communications et démonstrations devront être membres de l'Association. Les étrangers à l'Association ne seront acceptés comme auteurs que s'ils ont pour co-signataire un membre de l'association, ou s'ils ont été invités par le Bureau à faire une communication, ou si un membre de l'Association ayant assisté aux recherches rapportées se charge de discuter le travail en séance.

En dehors des Congrès, dont la périodicité et la date sont fixées par l'Assemblée Générale sur la proposition du Bureau, l'Association se réunit en séances consacrées à des communications scientifiques, le premier jeudi de chaque mois (août et septembre compris), à 16 heures. Les séances ont lieu au Grand Amphithéâtre de l'Institut Pasteur ; elles sont publiques.

Les membres désirant présenter des communications sont priés d'en aviser le Secrétaire général, et de lui en communiquer le titre, pour permettre l'établissement de l'ordre du jour de la réunion. Le texte des communications doit être remis à la séance, établi en double exemplaire, en exemplaire dactylographié original. La bibliographie

des auteurs cités sera établie, conformément aux règles admises par l'Association Internationale de Microbiologie, dans l'ordre suivant : nom de l'auteur, titre du périodique (en abrégé et en italiques), année de publication, tome (en chiffres arabes gras), page. Les signes t., p., etc., sont supprimés. Les abréviations des noms de périodiques courants figurent sur une liste qui sera adressée aux auteurs, sur leur demande. Les figures illustrant le texte doivent être remises avec leurs clichés typographiques, sinon il pourra en résulter des délais de publication. La Rédaction se charge, le cas échéant, de faire faire tous les dessins, graphiques, tracés, et de faire cliché aux frais des auteurs, tous les documents qui lui seront adressés dans les temps, soit huit jours au moins avant la séance, pour parution dans le numéro suivant des *Annales de l'Institut Pasteur*.

Le Secrétaire général : P. LÉPINE.

Séance du 6 Juillet 1950.

SOMMAIRE

	Page
Présentation d'ouvrage	32
Communications :	
Sur la place des virus et sa représentation dans l'échelle des êtres organisés, par PIERRE LÉPINE et TAGE STRUNGE	32
Structure alvéolaire des <i>Spherophoraceae</i> mise en évidence sur lame par les solvants des lipides, par A.-R. PRÉVOT, P. TARDIEUX et M. RAYNAUD	32
Étude d'une nouvelle espèce anaérobie tellurique amylolytique <i>Clostridium amylolyticum</i> n. sp., par A.-R. PRÉVOT et R. SAISSAC	32
Culture des bactéries anaérobies à l'air libre en milieu VF.S. papainique. Emploi du milieu VF.S. papainique pour l'isolement rapide des anaérobies, par J. BRISOU	33
Libération de l'antigène glucido-lipidique de <i>Salmonella enteritidis</i> var. Danysz par la lyse bactériophagique, par R. WAHL et A. TERRADE	33
Relations antigéniques entre vibron cholérique et brucelles, par J. GALLUT	33
Étude quantitative de l'hémolyse par les acides gras (deuxième note), par D.-G. DERVICHIAN	33
Action bactéricide pour le bacille de Koch de la vitamine C à doses élevées. Comparaison avec son action sur un certain nombre d'autres microbes, par P. PICHAT et A. REVEILLEAU	34
Modifications apportées chez l'homme au pouvoir bactéricide du sérum sanguin et des urines par l'utilisation à hautes doses de la vitamine C : pouvoir bactéricide pour le bacille de Koch d'une part, pour un certain nombre d'autres microbes d'autre part, par P. PICHAT et A. REVEILLEAU	34
Réaction d'hémagglutination type Middlebrook-Dubos réalisée avec les hématies humaines O et la nouvelle tuberculine I.P. 48, par R. SOHIER, I. TRIMBERGER et J. JUILLARD	34
Épreuves cutanées aux suspensions de bacilles BCG tués. Résultats obtenus, par R. SOHIER, J. GOUTAYER et H. GOUTAYER	35
Sur l'extraction des humates et l'emploi de ces extraits dans les milieux destinés à la culture des microbes du sol, par HÉLÈNE WINOGRADSKY	35
Livres reçus	35

RECEIVED
OCT 30 1950
CHESBROUGH